

# **Entwicklung eines in vitro-Systems zur Prüfung der initialen Plaqueadhärenz an dentalen Biomaterialien**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Dipl.-Biol. Ronald Schade**

geboren am 12.12.1964

in Hildburghausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Stephan Diekmann
2. Prof. Dr. Klaus D. Jandt
3. Prof. Dr. Jürgen Geis-Gerstorfer

Tag des Rigorosums: 13.01.2005

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.02.2005

Meinem Vater, Dr. Heinrich Schade, gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. DIE DENTALE PLAQUE – EIN KARIOGENER BIOFILM.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. PLAQUEBILDUNG .....</b>	<b>6</b>
1.3.1. INITIALE ADHÄSION .....	6
1.3.2. WACHSTUM DER PLAQUE UND ZELL-ZELL-KOMMUNIKATION .....	8
1.3.3. HOMEOSTASE DER PLAQUE .....	12
1.3.4. STRATEGIEN ZUR PLAQUEKONTROLLE .....	13
<b>1.4. INITIALE ADHÄSION – EINFLUSS DER OBERFLÄCHENENERGIE UND         OBERFLÄCHENTOPOGRAFIE .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5. IN VITRO-SIMULATION DER PLAQUEBILDUNG .....</b>	<b>19</b>
1.5.1. CHEMOSTAT-BASIERENDE SYSTEME.....	21
1.5.2. CONSTANT DEPTH FILM FERMENTER (CDFF) .....	22
1.5.3. ARTIFICIAL MOUTH.....	23
<b>1.6. ARBEITSTHESE .....</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1. MATERIALIEN.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2. EINSTELLUNG DER OBERFLÄCHENTOPOGRAFIE .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3. BESTIMMUNG DER MATERIALOBERFLÄCHENENERGIE .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. MIKROORGANISMEN UND MEDIEN .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5. IN VITRO-PLAQUESIMULATION .....</b>	<b>30</b>
2.5.1. BIOREAKTORDESIGN .....	30
2.5.2. VORKULTIVIERUNG .....	31
2.5.3. KONTINUIERLICHE REINKULTUREN .....	32
2.5.4. KONTINUIERLICHE MISCHKULTUR.....	32
2.5.5. FLIESSKAMMERDESIGN .....	33
<b>2.6. ANALYTISCHE METHODEN.....</b>	<b>35</b>
2.6.1. RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (REM).....	35
2.6.2. FOURIER-TRANSFORMIERTE INFRAROTMIKROSKOPIE (FTIR).....	36
2.6.3. LASERINDUZIERTES FLUORESCENZDETEKTION (LIF).....	36
2.6.4. KONFOKALE LASERSCANNING-MIKROSKOPIE (CLSM) .....	37
2.6.5. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER BAKTERIENZAHLE .....	37
2.6.6. STATISTISCHE ANALYSE .....	40

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
3.1.	BAKTERIELLE WACHSTUMSKINETIK IN BM-MEDIUM .....	43
3.2.	IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DER OBERFLÄCHENENERGIE UND- TOPOGRAFIE AUF DIE PLAQUEADHÄRENZ.....	45
3.2.1.	MATERIALOBERFLÄCHENTOPOGRAFIE .....	45
3.2.2.	MATERIALOBERFLÄCHENENERGIE.....	45
3.2.3.	REM .....	51
3.2.4.	FTIR-MIKROSKOPIE .....	52
3.2.5.	LIF-DETEKTION.....	55
3.2.6.	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER BAKTERIENZAHL .....	57
3.2.7.	CLSM .....	61
3.2.8.	ZUSAMMENFASSUNG .....	63
3.3.	IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN AN PRAXISRELEVANTEN DENTALMATERIALIEN.....	63
3.3.1.	MATERIALOBERFLÄCHENTOPOGRAFIE .....	64
3.3.2.	MATERIALOBERFLÄCHENENERGIE.....	66
3.3.3.	REM .....	69
3.3.4.	FTIR-MIKROSKOPIE .....	71
3.3.5.	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER BAKTERIENZAHL .....	72
3.3.6.	ZUSAMMENFASSUNG .....	74
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>75</b>
4.1.	IN VITRO-PLAQUEPRÜFUNG .....	75
4.2.	METHODISCHER VERGLEICH MIT ALTERNATIVEN IN VITRO-VERFAHREN .....	80
4.2.1.	GERÄTETECHNISCHE AUSSTATTUNG .....	80
4.2.2.	MEDIEN UND SUPPLEMENTE .....	81
4.2.3.	BAKTERIENKULTUREN .....	83
4.2.4.	BAKTERIENKULTIVIERUNG UND MATERIALINKUBATION.....	85
4.2.5.	QUANTITATIVE ANALYSE DER ZAHL ADHÄRIERTER MIKROORGANISMEN .....	87
4.2.6.	WEITERE VERFAHREN ZUR BEWERTUNG DER PLAQUEADHÄRENZ .....	90
4.3.	EINFLUSS DER OBERFLÄCHENTOPOGRAFIE UND OBERFLÄCHENENERGIE .....	96
4.4.	IN VIVO-RELEVANZ .....	102
4.5.	APPLIKATIONEN UND AUSBLICK .....	105
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>108</b>
<b>A</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>A-I</b>
	PUBLIKATIONEN .....	A-I
	LEBENSLAUF .....	A-IV
	DANKSAGUNG .....	A-V
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	A-VI

---

## Zusammenfassung

Die dentale Plaque stellt ein klassisches medizinisches Biofilmproblem mit hohen gesundheitlichen Folgen dar und verursacht enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Eine effektive Plaqueprävention durch die tägliche Zahnpflege, gesunde Ernährung und plaquehemmende Zusätze in Zahncremes und Mundwässern kann durch eine geeignete Auswahl an prothetischen Dentalwerkstoffen mit minimierter Plaqueadhärenz unterstützt werden. Einen wesentlichen Ansatzpunkt stellt dabei die Verzögerung der initialen Adhäsion dentaler Mikroorganismen an der Oberfläche von Restaurationsmaterialien auf der Basis topografischer und energetischer Modifizierungen der Materialoberflächen dar. Die Prüfung der Plaqueadhärenz im Sinne einer biologischen Materialtestung liefert die notwendige Rückkopplung für Hersteller dentaler Biomaterialien zur Entwicklung angepasster prothetischer Zahnersatzwerkstoffe. In vitro-Testungen können dabei ein geeignetes Werkzeug für Screening-Prüfungen unter reproduzierbaren Prüfbedingungen darstellen unter der Voraussetzung, dass sie die wesentlichen Randbedingungen für klinisch relevante Prüfergebnisse bereitstellen.

In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines in vitro-Prüfdesigns auf der Basis der Chemostat-Kultivierung einer bakteriellen Mischkultur dentaler Mikroorganismen mit angekoppelten Fliesskammern vorgestellt. Die kontinuierliche Kultivierung von fünf dentalen Bakterienstämmen in Reinkultur (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*) mit anschließender kontinuierlicher Mischkultivierung während der Prüfphase von 15 bis 89 Stunden unter wachstumslimitierten Bedingungen gewährleistet die notwendige biologische Reproduzierbarkeit und erlaubt eine zeitlich unabhängige Prüfung der Plaqueadhärenz. Die zu prüfenden Proben werden in speziell entwickelten Fliesskammern fixiert und im Cross-Flow-Verfahren mit der Mischkultur überströmt. Die Menge der in Abhängigkeit der Materialoberflächenparameter adhärierenden Bakterien wird qualitativ und quantitativ bewertet mittels direkter Zählung fluoreszenzmarkierter Bakterien, der Rasterelektronenmikroskopie, FTIR-Mikroskopie, LIF-Detektion und CLSM-Analyse.

Das entwickelte Testdesign liefert zum einen reproduzierbare Testbedingungen für vergleichende Prüfungen der Plaqueadhärenz auf Dentalwerkstoffen, typische Plaquebildungsprozesse in der frühen Phase der Bakterienakkumulation, eine gegenüber in vivo-Versuchen niedrigere Varianz der Testergebnisse und eine für Routineprüfungen notwendige Beherrschbarkeit des Testablaufes. Es ist daher unter strikter Fokussierung auf die Prüfung der initialen Adhärenz als Modellsystem für die Bewertung des Plaquebildungspotentials dentaler Biomaterialien im in vitro-Verfahren geeignet. Hinsichtlich der Notwendigkeit klinisch relevanter kosten- und zeiteffizienter sowie ethisch

---

unbedenklicher in vitro-Prüfungen für die Biomaterialprüfung stellt das System die Basis für die Weiterentwicklung als standardisierbares in vitro-Prüfverfahren der Plaqueadhärenz auf dentalen Biomaterialien dar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit anhand experimenteller Modellversuche an Titan, Gold und PTFE mit abgestuften Rauigkeiten zeigen, dass der klinisch bestimmende Einfluss der Oberflächentopografie auf die initiale Plaqueadhärenz bei  $R_a$ -Werten oberhalb von  $0,1\text{ }\mu\text{m}$  mit Hilfe des entwickelten in vitro-Prüfsystems reproduziert werden kann. Danach ist auf rauheren Materialoberflächen eine erhöhte Zahl initial adhärierter Bakterien detektierbar. Der Einfluss der Materialoberflächenenergie wird bei Materialien mit polierten Oberflächen ( $R_a$ -Werte  $\leq 0,1\text{ }\mu\text{m}$ ) sichtbar. Für die untersuchten Materialien wurde eine erhöhte Plaqueadhärenz auf Oberflächen mit verringerter Oberflächenenergie detektiert. Die Ergebnisse deuten auf einen adhäsionsinhibitorischen Effekt bei geringer Polarität der originären Materialoberfläche hin. Die Adsorption von Speichelproteinen (Albumin) an den Materialoberflächen während der in vitro-Prüfung führt zur Angleichung bestehender Unterschiede der integralen Oberflächenenergie der untersuchten Materialien. Die Adhärenz der Bakterien wird dabei zunehmend von einer materialspezifischen Proteinadsorption mitbestimmt, die dann in der Regel keine kausale Bewertung der Plaqueakkumulation anhand polarer und dispersiver Komponenten der Oberflächenenergie zulässt.

Vergleichende Untersuchungen an prothetischen Materialien der Dentalpraxis (Goldlegierung Degunorm, Kompositwerkstoff Definite, Keramik Duceragold und Co-Cr-Legierung Biosil L) mittels standardisierter in vivo-Probandentests zeigen eine mit den in vitro-Prüfungen übereinstimmende Bewertung hinsichtlich der Stärke der initialen Plaqueadhärenz nach 15 Stunden Inkubation. Sie unterstreichen die hohe klinische Relevanz des in vitro-Prüfsystems.

# 1. Einleitung

## 1.1. Problemstellung

Mikroorganismen sind ubiquitär. Die Anpassung an extremste Umwelteinflüsse gelingt ihnen durch äußerst vielfältige Stoffwechselleistungen sowie Schutzmechanismen. Die Überlebensfähigkeit in natürlichen Ökosystemen wird dabei durch die Organisation in Biofilmen gesteigert. Man geht davon aus, dass in der Natur über 90 % aller Mikroorganismen in Biofilmen organisiert sind [1]. Sie stellen damit die mit Abstand am weitesten verbreitete Organisationsform von Bakterien dar. Die planktonische Phase spielt hauptsächlich nur bei der Verbreitung über strömende Medien eine Rolle. Biofilme sind stets einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt und sind eine Anpassung an die bestehenden Bedingungen im vorliegenden Ökosystem. Biofilme können dabei sehr vielfältig strukturiert sein. Prinzipiell sind sie aus lebender Biomasse, abgestorbenem Zelldetritus sowie der Matrixsubstanz aufgebaut. Die wesentlichen Vorteile der Organisation in Biofilmen bestehen a) in der Möglichkeit, Nährstoffe in der Biofilmmatrix zu speichern, um natürliche Limitationen ausgleichen zu können, b) in der synergistischen "Arbeitsteilung" zwischen unterschiedlichen Spezies, die sich insbesondere durch metabolische Wechselbeziehungen manifestiert sowie c) in der Steigerung der Resistenz gegenüber äusseren Einflüssen wie Austrocknung, Scherkräften, antibakteriellen Agenzien und Phagozytose. Sind pathogene Bakterienspezies an der Biofilmbildung beteiligt, so kann dies zur Produktion und permanenten Freisetzung von Toxinen führen. Die Persistenz eines Biofilms auf natürlichen sowie künstlichen Substratmaterialien ist daher insbesondere in der Biomedizin mit einer Erhöhung des potentiellen Infektionsrisikos und der Gefahr der mikrobiell induzierten Materialdegradation verbunden. Aus wirtschaftlicher Sicht verursachen Biofilme in aquatischen Systemen sowie medizinische Biofilme die bedeutendsten Schäden. Biofilme in Wasserkreisläufen, der Trinkwasser- und Abwasseraufbereitung, in den verschiedensten Körperhöhlen des Menschen sowie auf biomedizinischen Instrumenten können zum Ausfall von industriellen Produktionsanlagen, Monitor- und Regeltechnik, zur Materialzerstörung (mikrobiell induzierte Korrosion, MIC) sowie zum Auftreten schwerer Infektionen führen.

Die nachteiligen Folgen von Biofilmen werden besonders in medizinischen Biofilmen sichtbar. So führt z.B. der Befall der Lunge durch *Pseudomonas aeruginosa* zur Ausbildung der cystischen Fibrose (CF). Die während der Biofilmbildung auftretenden Änderungen des Genexpressionsmusters führen hier zum phänotypischen Wechsel von nichtmucoiden zu mucoiden Keimen, die sich durch eine starke Produktion von Polysacchariden und der Freisetzung bakterieller Toxine auszeichnen und das bekannte Krankheitsbild hervorrufen [2].



Einer der am weitesten verbreiteten medizinischen Biofilme ist die dentale Plaque. Der ursächliche Zusammenhang zwischen der Plaquebildung und kariösen Läsionen sowie Periodonterkrankungen ist seit langem bekannt und verursacht erhebliche Kosten der zahnmedizinischen Versorgung. Gleichfalls unterliegen Zahnersatzmaterialien, die in der Mundhöhle dem ständigen Angriff sich bildender Plaquefilme ausgesetzt sind, der Gefahr der Degradation. Insbesondere bei metallischen Werkstoffen können aufgrund der Bildung organischer Säuren durch azidogene Bakterien Materialkomponenten freigesetzt werden (MIC) und lokale sowie systemische Schädigungen des Organismus hervorrufen. Die in der klinischen Praxis beobachteten Metallunverträglichkeitsreaktionen besitzen trotz der fortgeschrittenen Entwicklung moderner Restaurationsmaterialien ein nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotential. Neben dem Einsatz plaquehemmender Substanzen vor allem in den Pflegemitteln für die tägliche Zahnhygiene tragen auch Materialien mit einem verringerten Plaquebildungspotential zur Verbesserung des therapeutischen Effektes von Zahnrestorationen bei. Auch wenn die Komplexität der Wechselbeziehungen zwischen Materialoberfläche und Mikroorganismus allgemeingültige Vorhersagen zum Adhäsionsverhalten erschwert, können durch gezielte Untersuchungen unter reproduzierbaren stabilen Versuchsbedingungen grundlegende Effekte oberflächenenergetischer sowie oberflächentopografischer Materialparametern auf die initiale Plaquebildung bestimmt werden. Werden die Ergebnisse als Basis für eine gezielte Materialauswahl sowie -bearbeitung genutzt, kann eine Minimierung der Plaquebildung erreicht werden. Die Voraussetzung für die Testung der Plaqueadhärenz stellt ein geeignetes Prüfsystem bestehend aus einem experimentellen Setup sowie geeigneten Analyseverfahren dar, dass als Teil einer umfassenden Bioverträglichkeitsprüfung praxisrelevante Voraussagen zur Plaqueadhärenz auf Dentalwerkstoffen erlaubt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Eignung eines entsprechenden, auf der Bioreaktortechnik basierenden in vitro-Testdesigns. Es werden a) der Effekt oberflächentopografischer sowie oberflächenenergetischer Materialparameter auf die initiale Adhäsion von dentalen Bakterien sowie b) die Plaqueadhärenz auf Dentalwerkstoffen der zahnärztlichen Praxis unter praxisrelevanten Testbedingungen untersucht. Durch die Simulation hinreichend genauer Ausgangsparameter soll eine klinisch relevante Plaqueprüfung im Rahmen einer screenenden in vitro-Biokompatibilitätsprüfung ermöglicht werden.

## **1.2. Die dentale Plaque – ein kariogener Biofilm**

Die dentale Plaque stellt einen klassischen Biofilm dar. Der Hauptanteil besteht zu etwa 80-90% aus Wasser. Das Trockengewicht setzt sich zu etwa 70% aus Bakterien zusammen. Den restlichen Anteil stellt die Matrix aus Polysacchariden, Speichelproteinen und Glycoproteinen. Extrazelluläre Polymere werden aus Saccharose gebildet. Bakterielle Zucker-Transferasen bilden langkettige Zuckerpolymere aus den Saccharose-Spaltprodukten Glucose (1,6- $\alpha$ -Glucane, 1,3- $\alpha$ -Mutan) und Fructose (2,1- $\beta$ -

Inulin, 2,6- $\beta$ -Fructan). Einige dieser Polymere sind wasserlöslich und können wiederum durch Hydrolasen gespalten und als Kohlenstoffquelle metabolisiert werden. Die wasserunlöslichen Polymere spielen eine Rolle bei der Strukturierung des Biofilms sowie der bakteriellen Adhäsion [3]. Die Mikroflora der Plaque ist ausserordentlich komplex. Da die Mundhöhle eine gleichbleibende Temperatur aufweist, eine hohe Feuchtigkeit besitzt, ständig ausreichende Nährstoffe zur Verfügung stellt und viele Nischen zur Besiedelung vorhanden sind, bietet sie einen idealen Lebensraum für Mikroorganismen. Neben den Bakterien als Hauptbesiedlern sind Hefen und sogar Protozoen anzutreffen, die in einem ökologischen Gleichgewicht stehen, das eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Mundgesundheit besitzt. Wird dieses Gleichgewicht z.B. durch mangelnde Mundhygiene bzw. Antibiotika gestört, können pathologische Folgeerscheinungen (u.a. Superinfektion mit *Candida albicans*) auftreten. Auch die sehr häufigen Krankheitsbilder der Karies, Gingivitis (Zahnfleischentzündung), Parodontopathien (Entzündungen und Degeneration des Zahnhalteapparates) sowie der Stomatitis (Schleimhautentzündung) manifestieren sich durch die Verschiebung des natürlichen Gleichgewichtes der Mundflora und nicht durch neu von aussen zugeführte Erreger. Insbesondere die bakterielle Mikroflora der Mundhöhle weist eine Vielzahl an Bakteriengattungen auf, die meist mit mehreren Spezies vertreten sind. In dentalen Plaques wurden über 500 Bakterienspezies nachgewiesen [4]. In Tabelle 1 sind Hauptvertreter dentaler Plaquebakterien zusammengefasst. Die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen in Plaques ist dabei nicht einheitlich und variiert in Abhängigkeit vom Auftreten in distinkten Mundarealen [3, 5] sowie während der Plaquereifung innerhalb des Biofilms [6, 7]. Daher muss zwischen verschiedenen Plaquetypen unterschieden werden. In Fissuren-Plaques wurden vornehmlich Gram-positive Bakterien nachgewiesen, wobei Streptokokken überwiegen. Gram-negative Bakterien, darunter obligat anaerobe Bakterien, treten in geringerer Zahl auf. Die Zahl der nachgewiesenen Spezies ist relativ gering und liegt bei durchschnittlich acht Spezies [8]. Die Mikroflora der approximalen Plaque in den Zahnzwischenräumen weist eine höhere Diversität auf. Etwa zur Hälfte werden die Plaquepopulationen von Streptokokken und Actinomyceten bestimmt. Jedoch ist gegenüber der Fissuren-Plaque der Anteil obligat anaerober Gram-negativer Spezies (insbesondere *Fusobacterium*, *Veillonella* und *Prevotella*) aufgrund des geringeren Redox-Potentials und der damit mehr anaeroben Verhältnisse höher [9, 10]. Diese beiden Plaquetypen sind insbesondere mit der Entstehung von Karies verbunden. Die gingivale Plaque, die sich in der für das Bakterienwachstum prädestinierten Gingiva-Spalte entwickelt, weist die größte Bakteriendiversität auf. Hier sind viele Gram-negative Spezies und obligat anaerobe Bakterien anzutreffen. Die Unterschiede der Zusammensetzung in den einzelnen Plaquetypen werden durch unterschiedliche Nährstoff- und Mikrohabitatbedingungen verursacht. Bakterien in Fissuren-Plaques nutzen Komponenten des Speichels, der als Haupt-Nährstoffquelle und Puffersubstanz dient. In den subgingivalen Spalten dagegen katabolisieren einige proteolytische Bakterien hauptsächlich Proteine und Glycoproteine aus der wirtseigenen gingivalen Spaltflüssigkeit (GCF) und tragen zur veränderten Populationszusammensetzung bei. Aufgrund der deutlichen

Gram-positiv	Gram-negativ
<i>Streptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Actinomyces</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Rothia</i> <i>Leptotrichia</i>	<i>Neisseria</i> <i>Veillonella</i> <i>Bacteroides</i> <i>Campylobacter</i> <i>Eikenella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Haemophilus</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Selenomonas</i> <i>Treponema</i> <i>Vibrio</i> <i>Spirochaeta</i>

**Tab. 1:** In dentalen Plaques nachgewiesene Gattungen dominierender Bakterien [3, 11]

Verringerung des Redoxpotentials im Gingivaspalt im Vergleich zum freizugänglichen Mundhöhlenraum sind hier ebenfalls anaerobe Bakterien bevorteilt [5].

Die Folgen der Dentalplaquebildung sind eines der größten gesundheitlichen Probleme. Neben den Parodontopathien, die die Entzündung und den degenerativen Angriff auf den Zahnhalteapparat (Parodont) umfassen, der Gingivitis und Stomatitis ist besonders die Zahnkaries ein alltägliches Problem, das durch mangelnde Zahnhygiene noch drastisch verstärkt und bereits im Kindesalter zu erheblichen Schädigungen des Zahnapparates führen kann [12]. Die Kariesentstehung ist ein komplexer Prozess. Die mikrobiologischen Faktoren wurden dabei kontrovers diskutiert [5]. Die spezifische Plaquehypothese geht davon aus, dass nur eine eingeschränkte Anzahl der in der dentalen Plaque vorkommenden Bakterienspezies zur Ausbildung der Karies beiträgt. Die nichtspezifische Plaquehypothese dagegen beschreibt die Kariesentstehung als Ergebnis der Gesamtaktivität der Plaquemikroflora. Marsh [13] dagegen vereinte die zwei Hauptelemente dieser Hypothesen zur ökologischen Plaquehypothese. Demnach ist die Karies das Ergebnis einer Änderung der lokalen Umgebungsbedingungen, die zu einer Verschiebung der Balance in der Mikroflora führt. In dentalen Plaques sind ständig kariogene Bakterien anzutreffen, die jedoch unter neutralen Umgebungsbedingungen kompetitiv sind und in relativ geringen Mengen auftreten. Eine Schlüsselstellung nimmt dabei *Streptococcus mutans* als extensiver Säurebildner mit einem hohen pH-Toleranzpotential ein. Die Mutans-Streptokokken sind als heterofermentative Bakterien im Gegensatz zu den meisten anderen Streptokokken-Spezies (homofermentativ) in der Lage, neben Milchsäure noch weitere organische Säuren zu produzieren. Der Energiegewinn pro Molekül Glucose steigt von 2

mol ATP/mol Glucose auf 2-3 mol ATP aufgrund gemischter Säuregärung und gibt damit den Mutans-Streptokokken einen Wachstumsvorteil [12]. Aber auch weitere Mikroorganismen, vornehmlich Streptokokken der *S. mitis*-, *S. salivarius*- und *S. anginosus*-Gruppe stellen kariogene Bakterien dar. Unter neutralen Bedingungen steht die Demineralisierung und Remineralisierung der Zahnhartsubstanz im Gleichgewicht. Steigt jedoch z.B. das Angebot an fermentierbaren Kohlenhydraten (z.B. durch die Nahrungsaufnahme), so sinkt der pH-Wert infolge der fermentativen Stoffwechselprozesse in der Plaque für längere Zeit unter den kritischen Wert von 5,5 [5]. Säuretolerante (aciduric) Mikroorganismen wie *S. mutans* und auch *Lactobacillus spec.* sind in einer derartigen Umgebung favorisiert, so dass der pH-Wert durch verstärkte Säureproduktion weiter sinkt und die Mineralisationsbalance der Zahnhartsubstanz in Richtung Demineralisierung verschoben wird. Diese Kettenreaktion demineralisiert die Zahnhartsubstanz sehr schnell und führt zu den bekannten kariösen Läsionen. Die Säureproduktion ist ebenfalls ursächlich verantwortlich für den zerstörenden Angriff auf dentale Restaurationsmaterialien und kann zur Freisetzung potentiell toxischer Materialkomponenten führen [14, 15]. Aber auch Mikroorganismen mit einer verringerten Säureproduktion sind an der Ausbildung der Karies im Rahmen komplexerer Wechselbeziehungen beteiligt. Mikrohabitate, die *per se* keine säuretoleranten Mikroorganismen aufweisen, können aufgrund wiederholter saurer Bedingungen verbunden mit der Hemmung vorherrschender Mikroorganismen durch Mutans-Streptokokken und Lactobacillen besiedelt werden. Marsh [5] führt aus, dass *S. mutans* als Schlüssel-Mikroorganismus sehr oft und in großer Zahl aus frühen Kariesläsionen isoliert werden kann, in späteren Phasen der Kariesentstehung aber generell eine höhere Diversität einschließlich azidogener sowie proteolytischer Bakterien anzutreffen ist. Das Auftreten von *S. mutans* korreliert jedoch nicht absolut mit der Kariesentstehung. So können Mutans-Streptokokken an Zahnarealen verbleiben, ohne dass es zu Demineralisierungen der Zahnhartsubstanz kommt sowie umgekehrt Kariessymptome auftreten, jedoch keine Mutans-Streptokokken nachweisbar sind. Diese Befunde weisen auf die Beteiligung weiterer azidogener Bakterien hin und zeigen das komplexe Interaktionsgeschehen bei der Kariesbildung. Dieses ist nicht nur auf die bakterielle Plaquepopulation beschränkt, sondern schließt auch die Wirtsfaktoren ein, zu denen u.a. die Zusammensetzung des Speichels [5] und die Immunabwehr [12] gehören.

### 1.3. Plaquebildung

Die Bildung der dentalen Plaque ist ein Prozess, der in verschiedenen Phasen stattfindet. Im Grundsatz entsprechen diese Phasen einem generellen Schema der Biofilmbildung:

- Initiale (reversible und irreversible) Adhäsion von Mikroorganismen an Materialoberflächen [16, 17]
- Wachstum des Biofilmes durch Mechanismen der (Co)-Adhäsion und Coaggregation sowie Matrix-Produktion [3, 5, 18]
- Triggerung stoffwechselspezifischer Reaktionen, der interbakteriellen Kommunikation und Genexpression [4, 12, 18-20]
- Ausbildung eines stationären Gleichgewichtes zwischen Biofilmwachstum und Ablösung [3, 5]

Unter den konkreten Bedingungen der Mundhöhle liegen jedoch der Zahnschmelz bzw. die Materialoberflächen nicht im gereinigten Oberflächenzustand vor. Sehr rasch adsorbieren Moleküle und bilden den konditionierenden Film (Pellikel, Pellicula dentis). Dieser ist gewöhnlich weniger als 1 µm stark. Nach ca. 90-120 min wird ein Plateau der Moleküladsorption erreicht. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, in dem die Zusammensetzung und die Struktur der Pellikelschicht ständig durch bakterielle Stoffwechselaktivitäten modifiziert werden kann [3]. Die Pellikelschicht setzt sich aus Proteinen, Glycoproteinen, Lipiden und Glycolipiden des Speichels zusammen und enthält weiterhin extrazelluläre bakteriogene Moleküle. Unter den wirtsspezifischen Molekülen konnten z.B. saure prolinreiche Proteine (PRP-1), Amylase, Lysozym, Statherin und Immunoglobuline nachgewiesen werden [21]. Zu den adsorbierenden bakteriellen Molekülen zählen Glycosyltransferasen und Glucane, die bei der Matrixproduktion im extrazellulären Umfeld der Bakterien sowie bei der Modulation bakterieller Adhäsionsprozesse an der Oberfläche eine wichtige Funktion erfüllen [22]. Die Pellikelschicht spielt aufgrund von adhesinvermittelten Wechselwirkungen eine enorme Rolle bei der initialen Adhäsion und Etablierung von Bakterien auf den Oberflächen [3, 4]. Sie wird jedoch auch als das schwächste und damit bestimmende Glied bei der Ablösung von Bakterien und zwar nicht nur in der initialen Phase der Adhäsion angesehen, was insbesondere bei der Applikation von Scherkräften zu beachten ist [17, 23, 24].

#### 1.3.1. Initiale Adhäsion

Die initiale Adhäsion der Bakterien wird durch den Antransport durch den Speichelfluss (bzw. andere wässrige Medien) eingeleitet, da nur wenige orale Bakterien motil sind [3]. Man geht sogar davon aus, dass die ersten adhätierenden Bakterien tote Biomasse darstellen und als adsorbierendes Material eine

Art Gerüst für die nachfolgenden adhärierenden Keime bilden [25]. Der erste, zufällige Kontakt der Bakterien mit der Oberfläche erfolgt passiv durch Brown'sche Bewegungen Sedimentationsprozesse, Flüssigkeitsströmung bzw. durch aktive Bewegung (lebender) Mikroorganismen [16, 22]. Die anschließenden Prozesse sind durch weitreichende physikochemische Interaktionen zwischen der Oberfläche und dem Mikroorganismus sowie topografische Oberflächenparameter gekennzeichnet und werden im Kapitel 1.4. noch genauer behandelt. Zu den agierenden Kräften zählen Van der Waal's-Wechselwirkungen und elektrostatische Interaktionen zwischen den geladenen Oberflächen der interagierenden Partner. Diese Phase der Adhäsion resultiert in dem Erreichen des sekundären Minimums der Freien Grenzflächenenergie (Gibbs-Energie), ist reversibel und relativ schwach [3, 5, 17, 22, 23]. Eine irreversible feste Bindung der Bakterien an die Oberfläche erfolgt durch kurzreichende Interaktionen, wenn die Bakterien die energetische Barriere zwischen sekundärem und primärem Energieminimum überwunden haben und in engem Kontakt mit der Oberfläche stehen. Diese Interaktionen werden als spezifische Wechselwirkungen bezeichnet (z.B. stereochemische Rezeptorbindungen), wenngleich sie auf grundlegenden nichtspezifischen Interaktionen beruhen [17]. Hierbei spielen auch hydrophobe bakterielle Zelloberflächenkomponenten eine Rolle, die durch dehydratisierende Effekte einen engeren Kontakt mit der Oberfläche realisieren können [3]. Die klassischen Untersuchungen von Ritz [7] zeigten, dass die initialen Besiedler Vertreter der Streptokokken darstellen. Listgarten [26, 27] fand dichte Pellikelschichten, an die morphologisch in regelmäßigen Säulen die initialen Streptokokken angelagert waren und postulierte, dass die Adhäsion über Rezeptorbindungen an Komponenten der Pellikelschicht vermittelt wird. Entgegen dem hohen kariogenen Potential von *S. mutans* und dem adhäsionsfördernden Effekt der von *S. mutans* synthetisierten nichtlöslichen Glucane adhärten jedoch Vertreter der *S. sanguinis*-Gruppe initial stärker. Gibbons et al. [28, 29] fand ähnliche Befunde und schlussfolgerte, dass die initiale Plaquebildung ein zweistufiger Prozess ist, in dem zuerst die Bakterien über spezifische Zelloberflächenadhesine an Pellikelkomponenten adsorbieren und anschließend die weitere Adhäsion über Zell-Zell-Bindungen stattfindet, die im Falle von *S. mutans* mit der Bildung von wasserunlöslichen 1,3- $\alpha$ -Glucanen gekoppelt ist. Gibbons bezeichnete diesen Prozess als Cohäsion, wobei sich zur Definition dieses Prozesses der allgemein akzeptierte Begriff der Coadhäsion durchgesetzt hat. Im Zuge ausgedehnter Untersuchungen, die bis heute nicht abgeschlossen sind, wurde die große Bedeutung von oberflächenassoziierten Adhesinen, die die initiale Adsorption an Speichelmolekülen der Pellikelschicht vermitteln, deutlich. Strukturell können die Adhesine Oberflächenproteine darstellen bzw. sind assoziiert mit fibrillären Zelloberflächenanhängseln. Sie treten bei einer Vielzahl an dentalen Mikroorganismen auf. Zu den Adhesinen zählen insbesondere die gut untersuchten Proteine der Antigen I/II-Familie oraler Streptokokken, Typ 1- und Typ 2-Fimbrien der Actinomyceten, Proteine der LraI-Familie, Fap1, Amylase-bindende Proteine und Oberflächenlectine. Eine umfassende Übersicht zur molekularen Struktur und Funktion der Adhesine ist bei Rosan [4] gegeben. Die vielschichtigen Interaktionen, die den molekularen Mechanismen der

adhesinvermittelten Bindung an Oberflächen zugrunde liegen, werden am Beispiel der Wechselwirkung von PRP-1 und Statherin als Rezeptoren der Typ 1-Fimbrien von *Actinomyces naeslundii* deutlich. Das Bakterium bindet an PRP-1, wenn dieses an der Oberfläche adsorbiert ist. Liegt es im Speichel gelöst vor, inhibiert es die mikrobielle Adhäsion [22]. Gibbons et al. [30] erklärte dieses scheinbar paradoxe Verhalten mit Konformationsänderungen von Proteinen bei Adsorption an der Zahnoberfläche, die versteckte Molekülsegmente freilegen und dann als Rezeptorstellen dienen. Solche als „Kryptitope“ bezeichnete Segmente werden bei Adsorption zugänglich bzw. können durch enzymatische Spaltung terminaler Sequenzen an adsorbierten Speichelproteinen freigesetzt werden. So werden z.B. durch die Neuraminidaseaktivität in Spaltflüssigkeiten von Periodontitis-Patienten terminale Sialinsäure-Reste abgespalten und Galactosyl-Gruppen freigesetzt. Dies resultiert in einer Reduktion der Adhäsion von Mikroorganismen wie *S. sanguinis* und *S. mitis* an Neuraminidase-sensitiven Rezeptoren, steigert jedoch die Adhäsion von Bakterien mit Galactosyl-bindenden Lectinen wie *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *Leptotrichia buccalis* und *Prevotella intermedia* [31]. Proteaseaktivitäten können über die Spaltung von Peptidbindungen zur Bindung an freigesetzten Arginin-Resten führen [22]. Solche Mechanismen erklären, warum sich bei Personen mit ungenügender Oralhygiene sehr rasch eine komplexe mikrobielle Plaqueflora ausbildet [32].

### 1.3.2. Wachstum der Plaque und Zell-Zell-Kommunikation

Für die Prozesse der Plaquereifung nach der initialen Adhäsion spielen sowohl Bindungen von Bakterien untereinander über Adhesinkopplungen [3, 4] wie auch metabolische, genetische und biochemische Kommunikationsprozesse eine große Rolle. Synergistische wie auch antagonistische Wechselwirkungen bestimmen die Entwicklung einer dentalen Plaque. In den letzten Jahren wurden auf diesem Gebiet bedeutende Fortschritte erzielt, wenngleich viele Fragen weiterhin offen sind und weiterer Forschungsbedarf besteht.

Bei der interbakteriellen Kommunikation und der Bindung weiterer Bakterien an initiale Besiedler unterscheidet man zwischen zwei Prozessen, die als Coaggregation (Bindungen von genetisch verschiedenen Bakterien in der planktonischen Phase) und Coadhäsion (Bindungen planktonischer Bakterien an bereits adhärenzte Bakterien) bezeichnet werden [18]. Beide Prozesse unterliegen den prinzipiell gleichen Mechanismen, wonach Adhesine coaggregierender Bakterien mit planktonischen Bakterien interagieren [33]. Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten von coaggregierenden Partnern (Streptokokken und Actinomyceten) unter Fließbedingungen zeigten, dass die Coadhäsion zwischen solchen Partnern 5-10 mal stärker ist, als zwischen nichtcoaggregierenden Partnern [34]. Man geht davon aus, dass die Coadhäsion und Coaggregation die Möglichkeit bietet, Signale an Biofilmbakterien weiterzugeben, die zu einer metabolischen und genetischen Kommunikation führen und wesentlich die mikrobielle Populationszusammensetzung, ihre Interaktionen und räumliche Strukturierung beeinflussen [18]. In der Phase der Biofilmmreifung sind die Prozesse der Coaggregation

und Coadhäsion sowie der interbakteriellen Kommunikation nicht zu trennen. Neben der Bedeutung für die Adhäsion einer Vielzahl an Bakterienspezies in der Plaque gewährleistet die Coaggregation auch das Überleben strikt anaerober Mikroorganismen unter aeroben Mundhöhlenbedingungen durch Coaggregation mit sauerstoff-verbrauchenden Aerobiern sowie sauerstoff-toleranten fakultativen Anaerobiern [35, 36]. Ohne Coaggregation können z.B. die anaeroben Fusobakterien nur weniger als 5 min in aeroben Bedingungen überleben [37]. Auch der Fakt, dass *F. nucleatum* mit fast allen Bakteriengattungen coaggregiert (aber nicht untereinander [3]), spielt eine wichtige Rolle bei der Plaquereifung. Diese Bakterienspezies erfüllt eine wichtige Funktion als „Coaggregationsvermittler“, da frühe Plaquebesiedler der Oberflächen sehr intensiv mit *F. nucleatum* coaggregieren, späte Besiedler jedoch oft nur wenig mit den frühen Plaquebakterien wechselwirken [38]. Hier fungiert *F. nucleatum* als Brücke zwischen frühen und späten Besiedlern [18]. Anhand der sogenannten „corncob“-Formationen [39] von Fusobakterien mit vielen weiteren Bakterien in reifenden Plaqueschichten wird ein weiterer Aspekt der bakteriellen Interaktion deutlich: die metabolische Kommunikation. Jeder der coaggregierenden Partner besitzt unterschiedliche metabolische Kapazitäten, so dass zwischen den coaggregierenden Bakterien eine symbiontische Gemeinschaft mit einer komplexen Kommunikation geschaffen wird. *F. nucleatum* verwertet Aminosäuren, Streptokokken fermentieren Kohlenhydrate zu Milchsäure und weiteren organischen Säuren, die Veillonellen als fermentierbare Substrate zur Verfügung stehen. Verschiedene Viridans-Streptokokken produzieren Sialidase und verschiedene Exoglycosidasen, die wiederum Glycan-Seitenketten von Serum-Glycoproteinen des Wirtes für die Metabolisierung bereitstellen [40]. Dieser intensive metabolische Austausch in Mikrokolonien der Plaque hat einen direkten Einfluss auf den Säurehaushalt und damit auch auf die bakterielle Zusammensetzung der Plaque, wie bereits beschrieben. Bei weiteren coaggregierenden Partnern wurde die Fähigkeit nachgewiesen, zweiwertige Kationen wie z.B.  $Mn^{2+}$  zu binden [41], die für die Komplexierung von Matrixsubstanzen und den Aufbau der Plaquestruktur sowie für Stoffwechselreaktionen benötigt werden. Die Funktion der  $Mn^{2+}$ -Bindung durch frühe Besiedler kann die Bereitstellung für spätere Besiedler sein, die nicht in der Lage sind, aus den Wirtsekreten die Ionen zu binden. Die Coaggregation erleichtert auch den Transport der Ionen durch die Plaque [18]. Metabolische Kommunikationen als Motor proteolytischer Angriffe auf Wirtsgewebe (u.a. Gingivitis, Stomatitis) sind ebenfalls beschrieben worden [42]. Aber auch antagonistische Interaktionen werden durch metabolische Kommunikationen gesteuert. So spielt die Produktion von Wasserstoffperoxid durch verschiedene Streptokokkenarten eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen aeroben und anaeroben Bakterien. Letztere sind mit periodontalen Erkrankungen assoziiert, so dass durch den antagonistischen Effekt der Wasserstoffperoxid-Produktion in Biofilmen letztlich auch Streptokokken zur Eindämmung bakteriogener Defekte des Periodonts beitragen [43]. Weiterhin ist bekannt, dass verschiedene Bakterienspezies oberflächenaktive Substanzen (Biosurfactants) ausscheiden, die primär Nahrungsstoffe durch Emulgierung verfügbar machen [44, 45], jedoch über physikochemische



Wechselwirkungen die adhäsiven Eigenschaften der Pellikelschicht modifizieren und so zur Ablösung adhärierter Bakterien beitragen. Die Produktion der Biosurfactants ist somit indirekt ein antagonistischer Faktor zur Coadhäsion [17].

Die Variation metabolischer Leistungen in dentalen Plaques ist unmittelbar an die genetische Kommunikation gekoppelt. Auch wenn die Forschungsergebnisse noch keine umfassende Bewertung der interbakteriellen Kommunikation auf genetischer Ebene erlauben, sind jedoch in den letzten Jahren insbesondere für Streptokokken, Actinomyceten und weiteren Gattungen zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden mit dem Ziel, die ablaufenden Zell-Zell-Interaktionen auf genetischer Ebene interpretieren zu können. So fand man, dass sehr oft große Multi-Gen-Fragmente der DNA zwischen Bakterien unterschiedlicher Spezies ausgetauscht werden [46, 47]. Untersuchungen zur Coaggregation von *S. gordonii* mit *A. naeslundii* zeigten, dass die Expression verschiedener Oberflächenproteine von *S. gordonii* modifiziert wird [18]. Für *Porphyromonas gingivalis* wurde eine kontaktabhängige Proteinsekretion beobachtet, wenn die Bakterien mit gingivalen Epithelzellen interagieren [48]. Xie et al. [19] fand, dass *Streptococcus cristatus*, ein Plaque-Kommensale, bei *P. gingivalis* die Expression einer Fimbrienuntereinheit (FimA), die für die Kolonisierung der Plaque verantwortlich ist und zum Wechsel einer kommensalischen zu einer pathogenen Plaque beiträgt, abreguliert. Die Signalaktivität konnte mit einem Oberflächenprotein von *S. cristatus* korreliert werden. Nach dem initialen Kontakt der beiden Mikroorganismen war *P. gingivalis* nicht mehr in der Lage, auf der Plaque zu akkumulieren. An *S. gordonii* wurde weiterhin nachgewiesen, dass orale Streptokokken durch Plasmid-DNA in menschlichem Speichel transformiert werden können [49]. Auch der Kontakt mit einer Oberfläche steigert die Expression von Genen. So fand Hudson et al. [50], dass die Expression der Gene für verschiedene Glycosyltransferasen nach Kontakt von *S. mutans* auf Oberflächen gesteigert wurde, wobei die Fructosyltransferase-Aktivität unbeeinflusst blieb. Daraus wurde geschlossen, dass die initiale Bindung von *S. mutans* die Produktion unlöslicher Glucane induziert und somit die Adhäsion steigert.

Die auf der genetischen Ebene stattfindenden Signalaktivitäten werden zusätzlich durch biochemische Signalübertragung ergänzt. Die als „Quorum sensing“ bezeichneten Prozesse scheinen eine generelle Eigenschaft von Biofilmen zu sein. Erreicht eine Plaquepopulation eine kritische Dichte, werden metabolische Aktivitäten, die DNA-Synthese und das Zellwachstum deutlich erhöht und zwar unabhängig von weiteren Faktoren. Dieser Prozess ist nicht auf einzelne Spezies beschränkt [51]. Man weiß, dass diese Interaktionen nicht durch externe Veränderungen (z.B. Nährstoffoptimierung) initiiert werden, sondern Interaktionen spezifischer Signalmoleküle mit Oberflächenrezeptoren vieler Bakterienspezies darstellen [12]. Der grundlegende Mechanismus unterscheidet sich nicht von dem der Genexpressionskontrolle [20]. Wachsen Quorum sensing-Bakterien, so scheiden sie eine Reihe von Signalmolekülen (Autoinducer) in sehr geringer Menge in das umgebende Medium aus. Wächst die Populationsdichte, steigt die Konzentration der Autoinducer bis zu einem Schwellenwert, was zur Aktivierung eines ganzen Sets an Genen führt [52]. Die zugrundeliegenden Systeme und die Art der

Autoinducer sind in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien verschieden. Gram-positive Bakterien scheiden Peptide aus, die als Signalmoleküle fungieren [53], wohingegen Gram-negative Bakterien offenbar zwei verschiedene Systeme verwenden. Ein System arbeitet mit verschiedenen acylierten Homoserinlactonen (AHLs) als Autoinducer. Das zweite System scheint verbreiteter zu sein, jedoch ist die Natur der Autoinducer noch nicht eindeutig geklärt [20]. Für die dentale Plaque sind bisher jedoch noch relativ wenig Daten zum Quorum sensing bekannt. Frias et al. [20] fand, dass nur eine geringe Zahl an bakteriellen Plaqueisolaten Autoinducer des zweiten Systems bilden. AHL-produzierende Isolate wurden nicht nachgewiesen. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass der Quorum sensing-Mechanismus eine Funktion bei der Kontrolle der Virulenzfaktoren dentaler Bakterienspezies besitzt [54]. Li et al. [55] zeigte ein „competence-stimulating peptide“ (CSP), das die Ausbildung eines Biofilmes bei *S. mutans* initiiert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Plaquereifung ist die Bildung extrazellulärer Polysaccharide (EPS) aus Saccharose. Entgegen der früheren Auffassung, dass die Polysaccharidproduktion die initiale Adhäsion dentaler Bakterien initiiert, weiß man heute, dass die unlöslichen EPS-Anteile einen großen Anteil an der strukturellen Integrität und Pathogenität der Plaque besitzen und als „universaler Kleber“ die Plaque zusammenhalten [12]. Da sie weder für Säuren noch für Zucker eine bedeutende Diffusionsbarriere darstellen [56-58], Zuckern eine hohe Penetration in tiefere Plaqueschichten erlauben, den Puffereffekt durch Bakterien reduzieren und somit zur Ansäuerung an der Plaque-Material-Grenzfläche beitragen, sind sie direkt an der Kariesausbildung insbesondere bei dicken Plaqueschichten beteiligt [59]. Glycosyltransferasen tragen zur Produktion von Glucanen bei, an die Glucan-bindende Proteine (GBPs) der Zellwandoberfläche binden und so zur interbakteriellen Aggregation und Plaqueakkumulation beitragen. Obwohl die GBP's für die glucanvermittelte Aggregation notwendig sind [60], sind die Verhältnisse zwischen Glucan-Bindung, Glucan-Synthese und Plaquebildung jedoch sehr komplex. Studien an GBP-Mutanten in Cokultur mit Glycosyltransferase-Rekombinanten haben gezeigt, dass das Verhältnis von Glucan und Glucan-bindenden Proteinen einen kritischen Faktor bei der Plaqueentwicklung darstellt und die Ausbildung von „intakten“ Plaquestrukturen von beiden interagierenden Partnern abhängt [61].

In wachsenden Plaquefilmen bilden sich aufgrund der beschriebenen komplexen Wechselbeziehungen lokale Gradienten essentieller Nährstoffe, des pH-Wertes, der Sauerstoffsättigung und verfügbarer Kationen aus, die die räumliche Strukturierung der Plaque massgeblich beeinflussen [3]. Dadurch werden unterschiedliche Wachstumsbedingungen geschaffen, die es erlauben, dass Mikroorganismen mit unterschiedlichen Anforderungen in einem Mikrohabitat existieren können, was unter homogenen Umgebungsbedingungen nicht der Fall sein könnte.

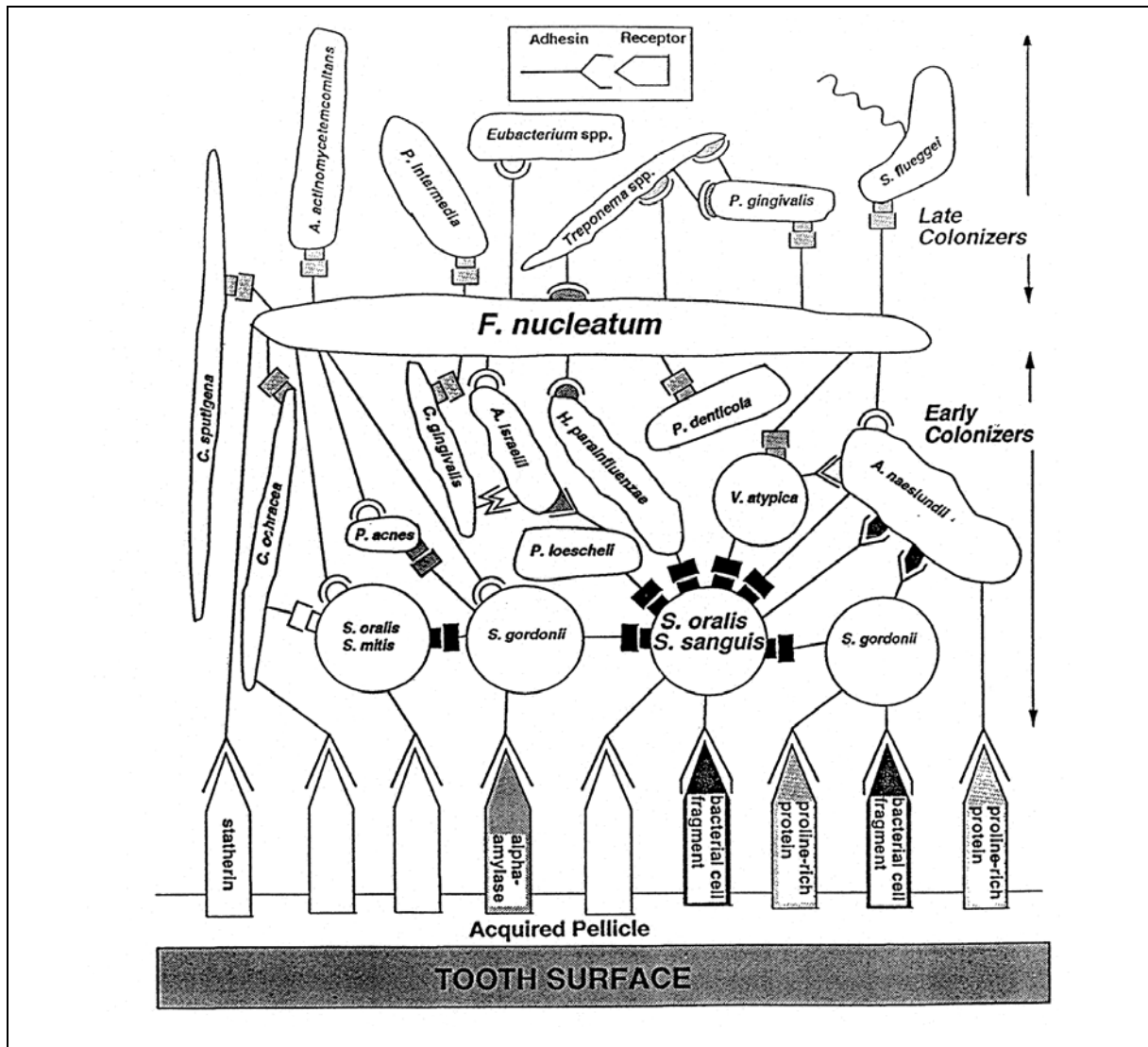
### 1.3.3. Homeostase der Plaque

Kann sich eine dentale Plaque unbeeinflusst entwickeln, so erreicht sie nach ca. 2-3 Wochen ein Gleichgewicht, das eine relativ konstante Populationszusammensetzung trotz regelmäßiger Umweltvariationen (Nahrungszufuhr, hormonelle Wechsel, Oralhygiene) hat und als mikrobielle Homeostase bezeichnet wird [3]. Dieses Gleichgewicht wird durch die dynamischen Interaktionen innerhalb der Plaque, einschließlich der synergistischen und antagonistischen Wechselwirkungen aufrechterhalten [13]. Wird es in bestimmten Grenzen von aussen aus dem Gleichgewicht gebracht, so können homeostatische Reaktionen das Gleichgewicht wieder herstellen. Dabei sind auch die Wechselbeziehungen mit dem Speichel und seinen Komponenten von großer Bedeutung. Dieser beinhaltet eine Vielzahl an Komponenten, die u.a. auch antibakterielle Funktionen besitzen. Immunoglobuline realisieren die Immunabwehr, das Lysozym inhibiert die Bakterienproliferation, Lactoferrin bindet Eisen und tritt damit in Konkurrenz um ein essentielles Spurenelement und das Lactoperoxidase-Thiocyanat-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-System setzt Sauerstoffradikale mit bakteriziden Effekten frei [62]. Bricht die Homeostase aufgrund verschiedenster Einflüsse (Verringerung des Speichelflusses, gesteigerte Zufuhr fermentierbarer Kohlenhydrate u.a.) zusammen, können die bereits genannten pathologischen Reaktionen eintreten.

Morphologisch besitzt die reife Plaque auf glatten Oberflächen eine Dicke von ca. 50-300 µm [63]. Durch Scherkräfte des Speichelflusses bzw. Kauvorgänge kann sie reduziert sein. Stärkere Plaqueschichten können an geschützten Stellen wie z.B. occlusalen Fissuren (bis 2 mm [64]), den approximalen Bereichen der Zahnzwischenräume und dem Gingivaspalt (bis 5 mm [65]) auftreten. Die Architektur einer reifen Plaque ist relativ offen. Sie weist Areale mit hoher Bakteriendichte auf, die mit Arealen flüssigkeitsgefüllter Kanäle abwechseln [66, 67] und zur Drainage und dem Stofftransport dienen können [68]. Bakterien in einer im Gleichgewicht befindlichen Plaque weisen gegenüber der planktonischen Phase veränderte Eigenschaften auf:

- eingeschränkte Penetration antibakterieller Agenzien in den Biofilm
- Inaktivierung von Agenzien durch Enzymaktivitäten
- relativ geringe Wachstumsrate
- Ausbildung eines neuen Phänotyps (z.B. Resistenz gegenüber antimikrobiellen Agenzien)

Aus einer reifen Plaque können Bakterien bzw. Bakterienverbände abgelöst werden und über den Speichel weitertransportiert werden, was die Besiedelung weiterer Areale erleichtert. Für einige Bakterien wurde dabei ein aktiver proteolytischer Abbau von bestehenden Bindungen gezeigt [5]. In Abbildung 1 ist ein Schema der komplexen Interaktionen in einer Plaque aufgeführt.



**Abb. 1:** Schema der Bindungsinteraktionen dentaler Mikroorganismen an Oberflächen (nach Rickard et al. [69])

#### 1.3.4. Strategien zur Plaquekontrolle

Die dentale Plaque ist ein Biofilm, der zur natürlichen Flora der Mundhöhle gehört und zur Aufrechterhaltung eines gesunden Gleichgewichtes beiträgt. Der Speichel trägt durch seine antibakteriellen Agenzien und dem mechanischen Scherstress des Speichelflusses wesentlich dazu bei, dass die natürliche Mundflora erhalten bleibt. Erst die Störung der Homeostase der Plaque durch die beschriebenen Prozesse führt zum Wechsel eines kommensalischen zu einem pathologischen Biofilm. Erfolgreiche Strategien zur Kontrolle der Plaque versuchen genau an diesem Punkt der Störung des Gleichgewichtes anzusetzen, um die exzessiven Folgen einer kariösen Plaque zu verhindern.

Die einfachste und sehr wirkungsvolle Methode wird täglich durch die ausreichende Zahnpflege eingesetzt. Die gründliche mechanische Entfernung von Plaquebakterien an exponierten Zahnarealen

durch Bürsten sowie die reduzierte Zufuhr zuckerreicher Nahrung kann fast komplett plaquebedingte Dentalerkrankungen verhindern [3].

Die Zugabe von Antiplaqueagenzien bzw. antimikrobiellen Substanzen zu Zahncremes und Mundwässern ist die heute gebräuchlichste Methode, um die konventionelle Zahnpflege zu unterstützen. Verschiedene Agenzien werden eingesetzt, zu denen pflanzliche Extrakte (Sanguinarin, ein Benzophenanthridin-Alkaloid aus dem Rhizom von *Sanguinarine canadensis*) [70], Metallsalze (Stannane, Zink), Enzyme (Glucanhydrolasen), quarternäre Ammonium-Verbindungen (Cetylpyridinchlorid), Chlorhexidine und Triclosan (5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-Phenol) zählen [3, 71-73]. Die Zugabe von Fluoriden kann nicht nur die Mineralisation der Zahnhartsubstanz stärken, sondern wirkt auch als Inhibitor des bakteriellen Metabolismus [74, 75].

Ein weiterer Punkt ist die Verwendung von Zuckerersatzstoffen wie Zuckeralkoholen (Sorbitol, Xylitol) bzw. nichtfermentierbarer Süßmittel (Aspartam, Saccharin). Diese stimulieren den Speichelfluss ohne Induktion der Säureproduktion und können zu einer raschen Remineralisierung früher kariöser Läsionen führen [5]. Wilson [76] fand, dass die wiederholte Anwendung von verschiedenen Polysacchariden (Alginat, Carrageenan) auf Materialoberflächen die Plaquebildung reduzieren kann.

Auch Impfstoffe auf der Basis spezifischer Oberflächenantigene von *S. mutans* wurden entwickelt [5]. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörper, die direkt auf die Zähne aufgebracht werden können und die Besiedelung der Zahnoberfläche mit *S. mutans* selektiv hemmen (z.B. über Blockierung des Antigen I/II). Dinis et al. [77] berichtete über die Immunisierung gegen das Virulenz-assoziierte Immunmodulierende Protein (VIP) von *Streptococcus sobrinus*. Weiterhin wurden die plaquereduzierenden Effekte polyklonaler Immunoglobulin G-Antikörper gegen die Glycosyltransferase [78] sowie die Lipoteichonsäure von *S. mutans* [79] gezeigt. Kürzlich wurde über einen neuen Impfstoff berichtet, der durch gentechnisch modifizierte Tabakpflanzen synthetisiert wird und gegen Karies eingesetzt werden soll (EUFIC, Europ. Informationszentrum für Lebensmittel). Diesen Entwicklungen steht jedoch noch die Zulassung aus.

Ein Angriffspunkt zur Senkung der Plaquebildung auf topografischer Ebene stellt die Versiegelung von Fissuren besiedelbarer Oberflächen dar [5]. Auch die Modifizierung oberflächenenergetischer Eigenschaften kann die Plaquebildung verringern, ohne notwendige Abtötung der Bakterien. Die molekularen und physikochemischen Grundlagen bilden dabei die Modelle der energetischen Interaktionen an der Grenzfläche von Bakterien und Materialoberflächen (siehe nächstes Kapitel). So modifizieren Detergenzien sowie substituierte Amino-Alkohole wie Delmopinol [80, 81] auf Zahnoberflächen angewandt die initialen Adhäsionsprozesse. Ähnliche Effekte können durch die Verwendung von Restaurationsmaterialien der Dentalprothetik mit verringerter Oberflächenenergie und Polarität erzielt werden, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen. Maetani zeigte den plaquereduzierenden Effekt Teflon-beschichteter Titanoberflächen [82].

## **1.4. Initiale Adhäsion – Einfluss der Oberflächenenergie und Oberflächentopografie**

Der Einfluss der Oberflächentopografie sowie oberflächenenergetischer Parameter auf die Plaquebildung wurde insbesondere durch die Arbeitsgruppen um Busscher [17] und Quirynen [16] intensiv untersucht. Man fand, dass in der Phase der initialen Adhäsion von Mikroorganismen die topografischen und energetischen Eigenschaften die Adhärenz und die Ausbildung einer Plaquepopulation bestimmen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Modifikation der Oberflächeneigenschaften einen Beitrag zur Plaquekontrolle liefern kann [16]. Bis heute ist jedoch noch keine universale Theorie zur Erklärung der fundamentalen Mechanismen der Bakterienadhäsion entwickelt worden und man geht davon aus, dass mehrere Mechanismen die Adhäsion wechselseitig beeinflussen [83-85]. Dies ist u.a. der Komplexität verschiedenster Makromoleküle der Zellwand und Zellmatrix, deren Interaktionen untereinander sowie der Wirkung nichtspezifischer Kräfte an der Grenzfläche von Bakterium und Materialoberfläche geschuldet. Trotzdem sind verschiedene oberflächenenergetische Konzepte vorgeschlagen worden, die auf der Interpretation der Freien Grenzflächenenergie (Gibbs-Energie) als Funktion des Abstandes zwischen Bakterien und Materialoberfläche basieren. Derzeit werden drei Modelle der Interaktionen zwischen Bakterien und Festkörperoberflächen diskutiert:

- die DLVO-Theorie (auf die im Weiteren noch näher eingegangen wird); sie schließt die Wirkung von Van der Waals-Kräften und elektrostatischen Interaktionen ein [86, 87],
- das Grenzflächenenergiekonzept, das auf der Bildung und Lösung von Grenzflächen zwischen Bakterien und Festkörperoberflächen basiert und als Gleichgewichtsmodell einzig die Differenz der Gibbs-Energien zwischen dem adhären und nichtadhären Zustand betrachtet und keine kinetischen Informationen zulässt [88, 89] und
- das Kolloidchemische Modell, das sterische Interaktionen zwischen Makromolekülen an den Oberflächen der involvierten Reaktionspartner berücksichtigt und kinetische Informationen zum Adhäsionsprozess ermöglicht [90].

Die DLVO-Theorie (nach ihren Begründern Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) lässt dabei eine schlüssige Interpretation der real ablaufenden Prozesse und ermittelten experimentellen Daten bei der Einleitung der initialen Adhäsion zu. Demzufolge interagiert ein Bakterium mit der Oberfläche in einem Abstand von ca. 50 nm über weitreichende (long range forces) und kurz reichende Kräfte (short range forces) [16].

Der Effekt der weitreichenden Kräfte beruht auf der Modellierung eines Bakteriums als kolloidaler Partikel, wenngleich Bakterien aufgrund ihrer komplexen Oberflächenstruktur und der Variabilität des

Phänotyps keine idealen Kolloide darstellen [91]. Im Prinzip wirken bei Annäherung eines Bakteriums an eine Oberfläche zwei Kräfte: Van der Waals-Kräfte und elektrostatische Kräfte [16].

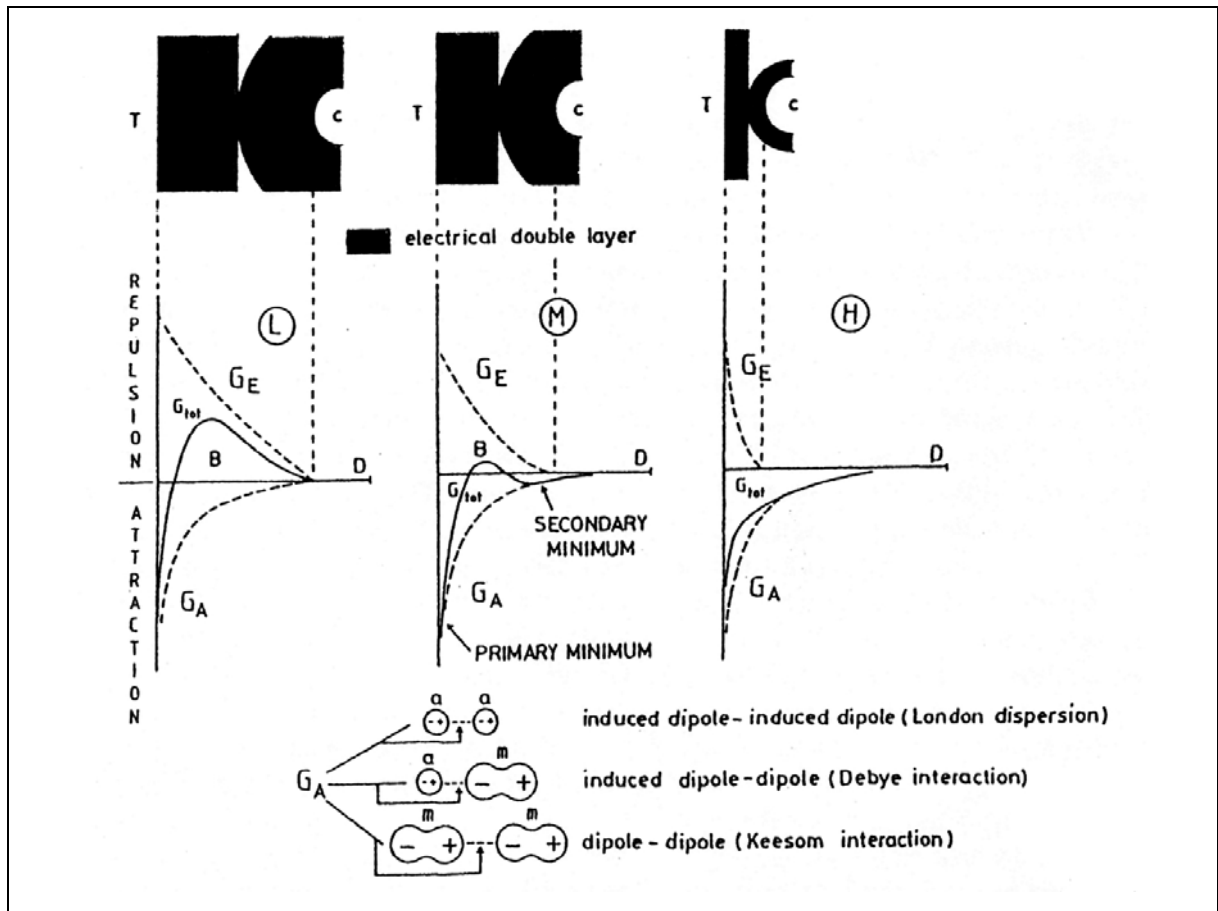
Für die Van der Waals-Kräfte ( $G_A$ ) wurden drei Komponenten identifiziert. Die London'schen Dispersionskräfte sind quantenmechanischer Natur und wirken aufgrund der Induktion von Dipolen. Debye-Kräfte treten zwischen induzierten und permanenten Dipolen auf. Keesom-Kräfte hingegen wirken lediglich zwischen permanenten Dipolen. Die Energie einer solchen Van der Waals-Wechselwirkung wird durch die Hamaker-Konstante [92] ausgedrückt.

Die elektrostatischen Kräfte ( $G_E$ ) werden durch die Interaktionen zwischen den Stern'schen Doppelschichten geladener Partikel bestimmt. Diese Doppelschichten entstehen, wenn geladene Partikel sowie Ladungen auf einer Oberfläche in wässrigen Medien durch Gegenionen neutralisiert werden. Überlappen sich die Stern-Schichten eines Partikels und einer Oberfläche, treten elektrostatische Interaktionen auf. Diese können attraktiv sein, wenn beide Partner eine unterschiedliche Nettoladung aufweisen und repulsiv sein, wenn gleiche Nettoladungen vorliegen. Der für eine Interaktion notwendige Abstand zwischen den Partnern wird durch die Dicke der Stern-Schicht bestimmt, die wiederum von der Stärke der Ladung der eigenen Oberfläche und der Ionenstärke des umgebenden Mediums abhängt. Bei hoher Ionenstärke nimmt die Dicke der Doppelschicht ab, so dass ein engerer Kontakt der interagierenden Partner notwendig ist, ehe elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Die Intensität der elektrostatischen Wechselwirkungen wird durch das Zeta-Potenzial ausgedrückt [93]. Laut DLVO-Theorie werden die weitreichenden Kräfte durch die Summe beider Kräfte bestimmt und als Freie Grenzflächenenergie ausgedrückt:

$$G_{tot} = G_A + G_E \quad \text{Freie Grenzflächenenergie (Gibbs-Energie); mit } G_A, G_E \text{ s.o.}$$

In Abbildung 2 ist ein Schema der weitreichenden Interaktionen dargestellt. Das mittlere Beispiel entspricht dabei laut Quirynen [16] den Verhältnissen in der Mundhöhle, die durch den Speichel als Medium mit mittlerer Ionenstärke bestimmt werden. Somit tritt bei Annäherung eines Partikels (Bakteriums) an die Oberfläche ein sekundäres Minimum der Gibbs-Energie auf. Dieses ist größer für interagierende Systeme mit hohen Van der Waals-Kräften bzw. großer Partikelgröße [94].

Da in der Mundhöhle die Oberflächen wie auch die Bakterien vorwiegend negativ geladen sind und die Bakterien vergleichsweise große Partikel darstellen, adhären die Bakterien reversibel im sekundären Minimum in einem Abstand von 5-20 nm [16]. Unter bestimmten Umständen, wenn sich ein tiefes sekundäres Minimum ausbildet, kann das Bakterium in diesem auch irreversibel adhären. Eine Adhäsion kann dann z.B. durch direkte Überbrückung des Abstandes zur Oberfläche über bakterieneigene Fibrillen und Fimbrien erfolgen [16]. Besitzen die Oberfläche des Bakteriums und der Materialoberfläche entgegengesetzte Ladungen, erreichen die Partikel das primäre Minimum ohne Schwierigkeiten und adhären irreversibel. Normalerweise erreicht das sekundäre Minimum jedoch



**Abb. 2:** Schema der weitreichenden Interaktionen zwischen einem negativ geladenen Bakterium und einer negativ geladenen Oberfläche (Gibbs-Energie gegen den Abstand D zur Oberfläche [16]). Beispiele drei verschiedener Ionenstärken des Mediums sind aufgeführt (oberer Teil: L=niedrig, M=mittel, H=hoch; T=Oberfläche, C=Bakterium). Im unteren Teil sind die drei Typen der Van der Waals-Kräfte dargestellt (a=Atom, m=Molekül).

keine großen negativen Werte, so dass ein Bakterium entweder durch Brown'sche Bewegung, Schereinwirkung des Speichels bzw. aktive Bewegung die Oberfläche auch wieder verlassen kann.

Die kurzreichenden Interaktionen bestimmen die Adhäsionsstärke des Bakteriums an der Oberfläche, wenn es das primäre Minimum (Abstand  $< 2\text{nm}$  von der Oberfläche) durch Überwindung der Energiebarriere (siehe Abb. 2, B) erreicht hat [16]. Sie sind durch eine ganze Reihe von Wechselwirkungen gekennzeichnet und umfassen u.a. Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbindungen. Da die DLVO-Theorie Aussagen über das Erreichen des primären Minimums macht, die tatsächlich wirkenden energetischen Interaktionen aufgrund einer Vielzahl an non-DLVO-Kräften (u.a. hydrophile und hydrophobe Interaktionen, Hydratationseffekte, sterische Wechselwirkungen) jedoch nur unvollständig erfasst, erwies es sich für weitere Untersuchungen als vorteilhaft, für die Beschreibung bakterieller Adhäsionsprozesse fundamentalere thermodynamische Ansätze anzuwenden. Von Absolom wurde daher die Freie Adhäsionsenergie definiert [83, 95]. Die Kalkulation geht davon aus, dass die Grenzflächen von Bakterium-Medium (bl) und Oberfläche-



Medium (sl) durch die Grenzfläche von Bakterium-Oberfläche (sb) ersetzt werden und in folgendem Zusammenhang stehen:

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad \text{Freie Adhäsionsenergie}$$

$\gamma_{sb}$ ,  $\gamma_{sl}$  und  $\gamma_{bl}$  stellen die Freie Grenzflächenenergie der an der Interaktion beteiligten Partner dar. Die Beziehung schliesst die Effekte von DLVO- und non-DLVO-Kräften ein, kann aber die einzelnen spezifischen Wechselwirkungen nicht auflösen. Anhand der oben aufgeführten fundamentalen Beziehung können theoretische Aussagen zur Adhäsion von Bakterien unter spezifischen Umgebungsbedingungen getroffen werden. Ist  $\Delta G_{adh}$  negativ, was einer Minimierung der freien Energie entspricht, ist die Adhäsion aus thermodynamischer Sicht bevorteilt und verläuft spontan, wenn der Wasserfilm zwischen beiden Partner entfernt werden kann. Dies kann durch den dehydratisierenden Effekt hydrophober Gruppen auf der Bakterienoberfläche erfolgen, der als bestimmender Mechanismus des Einflusses der Hydrophobizität auf die Adhäsion angesehen wird [23]. In einigen Fällen können Bakterien auch in einem bestimmten Abstand von der Oberfläche aufgrund der sterischen Behinderung durch adsorbierte Oberflächenpolymere verbleiben und dadurch die Wirkung von DLVO-Interaktionen relativieren. Auf der Basis dieses theoretischen Modells der initialen Adhäsionsprozesse kann jedoch anhand experimenteller Daten der Einfluss oberflächenenergetischer Parameter von Substratmaterialien auf die Bakterienadhäsion und somit auch auf die Plaquebildung verifiziert werden, wenngleich die ausserordentlich große Komplexität der interagierenden Partner an Materialoberflächen der Mundhöhle (Speichel, adsorbierte Proteinschichten, Bakterien unterschiedlicher Spezies) eine umfassende und kausale Bewertung erschwert.

Wesentlich schlüssiger lässt sich der Einfluss der Oberflächentopografie auf die initiale Adhäsion und Plaquebildung fassen. Man fand, dass die initiale Besiedelung auf Zahnoberflächen von Oberflächenirregularitäten wie Spalten, Furchen und Abrasionsdefekten ausgeht und sich von diesen auf andere Areale ausbreitet [96-99]. Als Ursache wird der Schutz vor Scherkräften des Speichelflusses [100] und mechanischer Abrasion [16] angesehen. Damit ist der Wechsel aus der reversiblen Phase der Initialadhäsion, die durch die beschriebenen energetischen Interaktionen bestimmt wird, zur irreversiblen Adhäsion bevorteilt. Die Steigerung der Zahl initial adhärierter Mikroorganismen infolge der Vergrößerung der Oberfläche (Faktor 2-3, [16]) ist ein weiterer Effekt rauher Oberflächen. Da die Proliferation der initial adhärerten Mikroorganismen entscheidend zur Zunahme der Biomasse der Plaque während der Etablierung einer Plaque beiträgt [101], wird die Bedeutung der Oberflächentopografie in der Phase der Initialadhäsion deutlich. Eine wichtige Konsequenz besteht in der Forderung, auf rein mechanische Materialoberflächenbehandlungen zu verzichten, die zur Erhöhung der Oberflächenrauigkeit führen bzw. Oberflächen prothetischer

Dentalmaterialien nur mit entsprechend geeigneten Oberflächenbehandlungsverfahren zu behandeln. Jedoch zeigen u.a. die Untersuchungen zum Lotus-Effekt [102], dass keinesfalls der Schluss gezogen werden kann, an ideal glatten Oberflächen adhäriert eine minimale Anzahl an Mikroorganismen.

Aufgrund der Bedeutung der Materialtopografie sowie der Oberflächenenergie von Substratmaterialien auf die initiale Adhäsion dentaler Bakterien, die wiederum die nachfolgende Plaqueakkumulation bestimmt, stellen diese zwei Parameter ein geeignetes Werkzeug zur gezielten Variation von Ausgangsbedingungen für die Validierung eines in vitro-Plaquesimulationsverfahrens dar, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde und als Teil einer umfassenden Biokompatibilitätsprüfung für die praxisrelevante Screening-Prüfung der Plaqueakkumulation bestimmt ist.

## **1.5. In vitro-Simulation der Plaquebildung**

Die Entwicklung von in vitro-Verfahren zur Simulation plaquebildender Prozesse ist prinzipiell in der Komplexität natürlicher Plaquebiofilme der Mundhöhle begründet. Sowohl für das grundlegende Verständnis der Plaquebildung, ihrer Struktur und der Interaktionen innerhalb einer Plaquepopulation, wie auch für praxisorientierte Prüfungen z.B. der Effektivität plaquebeeinflussender Agenzien wurden Testverfahren benötigt, die a) reproduzierbar durchgeführt werden konnten und b) eine vergleichende Interpretation der Ergebnisse zuließen. In vivo-Prüfungen mit Hilfe von Probanden bzw. Tierversuchen bieten eine hohe Praxisrelevanz im Hinblick auf die Testung unter den Bedingungen einer komplexen Mundhöhlensituation. Jedoch sind die Nachteile von in vivo-Prüfungen nicht zu vernachlässigen. Zu diesen zählen a) die teilweise großen inter- und intraindividuellen Unterschiede des physiologischen Status eines Probandenkollektivs, die individuellen Tragegewohnheiten von Testschienen und Haltevorrichtungen für die zu testenden Proben sowie die Heterogenität der Plaquebildung in der Mundhöhle [67, 103-106], die nur sehr heterogene Testergebnisse liefern und die Interpretation erschweren [103], b) die nicht unumstrittenen ethischen Aspekte, da die Gefahr der Induktion von Gingivitis besteht [103] sowie neue, nicht zugelassene Materialien in ihrer Testphase bezüglich ihrer Bioverträglichkeit nicht eingeschätzt werden können und c) der logistische Aufwand aufgrund notwendiger Genehmigungsverfahren sowie die Zahl und Auswahl von Probanden, die relativ hohe Kosten verursachen [103, 107]. Die Nachteile von in vivo-Prüfungen schränken die Anwendung für gezielte Prüfungen zum Interaktionsgeschehen wie auch Screening-Prüfungen eines großen Probenkollektivs deutlich ein.

Die Idee, die Plaquebildung mit Hilfe von Laborversuchen zu untersuchen, ist schon 1878 von Magitot vorgeschlagen worden [108]. Die grundlegende Voraussetzung für in vitro-Verfahren ist, dass die Ergebnisse eine hinreichend gute Korrelation zur in vivo-Situation zeigen. Da die in vivo-Testungen

selbst aufgrund der variablen Testbedingungen teilweise hohe Streuungen aufweisen und oft eine direkte Vergleichbarkeit nicht möglich ist, erscheint die Validierung von in vitro-Verfahren äußerst schwierig. Der wesentliche Vorteil einer in vitro-Prüfung besteht jedoch in der Kontrollierbarkeit der Testbedingungen [103]. Werden grundlegende Testvoraussetzungen, wie ein realistisches bakterielles Modell der Plaque, Simulation homeostatischer Mundhöhlenbedingungen (Temperatur, pH, Sauerstoffpartialdruck) sowie mechanische und biochemische Einflussfaktoren (z.B. Scherkräfte, Proteine) zugrundegelegt und konstant gehalten, können aus in vitro-Ergebnissen durchaus Schlussfolgerungen auf die in vivo-Situation gezogen werden.

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl an Systemen und Verfahren angewandt worden, die sich teilweise deutlich unterscheiden. Im Prinzip bestimmen zwei Zielrichtungen das Design der in vitro-Plaquesimulation, wobei die Einteilung durch Gilbert [109] in investigative und replikative Modelle die grundlegende Ausrichtung hinreichend beschreibt:

- Untersuchung spezifischer Prozesse der Plaquebildung (investigativ)
- Simulation naturnaher Plaquebiofilme (replikativ)

Die zugrundeliegenden verschiedenen methodischen Ansätze besitzen je nach ihrer Zielstellung ihre Berechtigung. Jedoch kann es im Verhältnis zwischen notwendigem Aufwand zur Simulierung naturnaher Plaquebiofilme und der zulässigen Reduzierung komplexer Testparameter für gezielte Untersuchungen von Teilprozessen kein System geben, das alle Aspekte befriedigend erfüllt [103].

Der einfachste und häufig verwendete Ansatz ist eine Batch-Kultur eines dentalen Mikroorganismus [103] in konventionellen Schüttelgefäßen bzw. Chemostaten. Dieses Modell kann als Basis für Biofilm-Modelle genutzt werden, ist jedoch aufgrund fehlender metabolischer, genotypischer und räumlicher Heterogenität der erzielten Bakterschichten von einer funktionellen Plaquesimulation weit entfernt.

Ein weiteres System ist die Effusionszelle nach Dibdin et al. [56, 110, 111]. Vorinkubierte Bakterschichten auf Membranen werden zwischen zwei Reaktionsräumen eingebracht und in Kurzzeitversuchen inkubiert. Meist werden Monokulturen eingesetzt. Diese Modell kann für die Untersuchung von Diffusionsprozessen und metabolischen Umsatzraten in Bakterienpopulationen eingesetzt werden und ist dann geeignet, wenn auf die funktionelle Arbeitsteilung und Heterogenität einer Plaque verzichtet werden kann.

Intraorale Modelle nutzen die Mundhöhle als Inkubationsraum und stellen damit im engeren Sinn keine künstlichen Biofilm-Modelle dar. Prinzipiell ähneln sie einem klassischen in vivo-Test, jedoch existieren einige Hybridsysteme, die weniger der technischen Umsetzung als dem methodischen Ansatz wegen interessante Ergebnisse ermöglicht haben. So fand Zero et al. [112] durch den Einsatz in vitro-vorinkubierter Zahnschmelzblöcke im Gaumenbereich, dass mit zunehmender Plaqueschichtdicke die

Demineralisierung am Zahnschmelz zunimmt, was mit dem Auftreten von EPS in Zusammenhang stand.

Durch die Einführung biotechnologisch basierter Kultivierungs- sowie verschiedener online-Analyseverfahren konnte die notwendige Steuerung und Konstanz der Testbedingungen erreicht werden. Diese Systeme bieten wesentliche Voraussetzungen für eine praxisnahe Plaquesimulation und bieten eine hohe Reproduzierbarkeit und Praxisrelevanz. Die gebräuchlichsten Verfahren unterscheiden sich dabei im Prinzip durch die Inokulation mit Mikroorganismen, der Medienversorgung und der Versuchsdauer.

### **1.5.1. Chemostat-basierende Systeme**

Ein Chemostat stellt ein System zur Kultivierung von Mikroorganismen im steady-state-Gleichgewicht dar. Aufgrund der notwendigen Regelung der Zufuhr von Nährstoffen entsprechend der Theorie der kontinuierlichen Bakterienkultivierung [113] stellen sie offene Systeme dar. Die meisten Systeme basieren auf der Bioreaktortechnologie und bieten somit weitere Vorteile der Regelung und Steuerung verschiedener Parameter wie der Temperatur, des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes im Medium sowie des Redoxpotentials. Im Gegensatz zu geschlossenen batch-Verfahren, die zeitlich veränderliche Mikroorganismenkulturen liefern, garantieren Chemostaten konstante Kultivierungsbedingungen und somit auch einen konstanten physiologischen Status der (planktonischen) Mikroorganismen. Ein wesentlicher Vorteil besteht in der Möglichkeit zur Durchführung von Langzeitexperimenten unter reproduzierbaren Bedingungen. Sowohl Reinkulturen wie auch komplexe Mischkulturen werden eingesetzt. Die Anwendung von Chemostaten als Basis für Plaquebiofilmuntersuchungen ist sehr weit verbreitet und insbesondere für die Untersuchung spezifischer Prozesse der Plaquebildung angewandt worden. Untersuchungen wurden durchgeführt, bei denen die Probematerialien direkt in die kultivierte Bakterienkultur getaucht [105, 114, 115] oder einem Fluss suspendierter Bakterien in externen Fliesskammern ausgesetzt wurden [116-118]. Beide Ansätze sichern die kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen. Die Fliesskammersysteme besitzen jedoch den Vorteil, anhand der gegebenen Geometrie und der eingestellten Fliessrate definierte Scherkräfte realisieren zu können [118] und gestatten u.a. eine in situ-Charakterisierung wachsender Biofilme über verschiedene mikroskopische Verfahren [119]. Jedoch können definierte Scherkräfte auch direkt in einem Chemostaten realisiert werden, was durch den von Bakke und Characklis [120] entwickelten Rototorque gezeigt wurde. Hier wird ein innerer rotierender Zylinder eingesetzt und die Proben an der Reaktorgefäßwand positioniert. Eine weit verbreitete Variante des Chemostat-Modells mit Fliesskammersystem stellt das Robbins Device dar [121-124]. Durch einen meist tubular ausgeführten Fliesskanal wird eine Bakteriensuspension gepumpt, die in einem separaten Konditionierungsgefäß kultiviert wird. In den Fliesskanal können bis zu 25 Kolben eingesetzt werden, die je eine Probe tragen. Ein wesentlicher Vorteil ist hierbei die hohe parallele Probenanzahl.

Allerdings weisen Adhäsionsversuche in einem Robbins Device aufgrund der In-Reihe-Schaltung der Probenkörper eine sinkende Zahl adhärrierender Bakterien mit zunehmender Länge auf, was vergleichende Untersuchungen erschwert [123]. Von Fowler [125] wurde der Radial Flow Biofilm Reactor entwickelt, der aus zwei parallelen Scheiben in einem Abstand von ca. 500 µm aufgebaut ist, wobei die Probenoberfläche eine der Scheiben bildet. In der Mitte der zweiten Scheibe wird die Bakteriensuspension eingeleitet, die dann radial nach allen Seiten über die Probenoberfläche ausströmt. Das Konzept der Fliesskammern ist äußerst flexibel und kann an die verschiedensten Problemstellungen angepasst werden. Das Applikationsspektrum umfasst Untersuchungen zur initialen Adhäsion [17, 117, 126], Coaggregation und Biofilmbildung [35, 36, 127], Studien zur Ablösung von Biofilmen [17], zum bakteriellen Metabolismus [128, 129], dem Effekt antimikrobieller Agenzien [36, 115], sowie der Genexpression und -regulation [114].

Eine gewisse Sonderstellung nimmt der Growth rate-controlled biofilm fermenter (GRBF) ein. Die auf Helmstetter und Cummings [130] zurückgehende Methode beruht auf der Perfusion einer bakterienbesiedelten Membran. Aufgrund der Diffusionseinschränkung bei wachsenden Plaqueschichten kann es zu Nährstofflimitationen kommen, die mit einer Abnahme der Wachstumsrate verbunden sind und die nicht durch die planktonische Phase ausgeglichen werden [121]. Diesen für Biofilme typischen Prozess [131] umgeht der Growth rate-controlled biofilm fermenter durch die Perfusion der Plaqueschicht. In Abhängigkeit der Wachstumsrate innerhalb des vorinkubierten Plaquesfilmes auf der Membran werden Tochterzellen durch die Perfusion ausgewaschen und aufgefangen. Die Methode wurde insbesondere für die Analyse der Wachstumsrate innerhalb von Plaquesfilmen [132], für Transportstudien [121] sowie für die Prüfung antibakterieller Agenzien [133] eingesetzt. Allerdings sind mit dieser Methode keine Testungen zur Biofilmbildung möglich.

Die in den anschließenden Kapiteln beschriebenen zwei replikativen Systeme verfolgen das Ziel, die dentale Plaque mittels eines in vitro-Verfahrens so naturnah wie möglich abzubilden. Beide Systeme erfüllen aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten hinsichtlich des unbeeinflussten Inkubationsregimes während der Plaquebildung und des Kultivierungszeitraumes die Anforderungen eines sogenannten „Plaque-Mikrokosmos“.

### **1.5.2. Constant Depth Film Fermenter (CDFF)**

Der von Peters und Wimpenny [134] entwickelte CDFF stellt ein Glasgefäß dar, das über Ports im Deckel mit Medium versorgt und begast wird sowie Ports für die Probenahme aufweist. Im Boden befinden sich Ports für den Medienauslass sowie eine Durchführung für eine drehbare Achse. Das Herzstück des CDFF bildet eine drehbare Metallscheibe mit einem Durchmesser von 15 cm im Inneren des Glasgefäßes, welche 15 PTFE-Pfannen mit je 5-6 Vertiefungen unterschiedlicher Höhe

(50-500  $\mu\text{m}$ ) aufweist [135]. In diese Vertiefungen werden Inokula dentaler Bakterien appliziert. Als Inokula wurden Reinkulturen [136], Mischkulturen aus neun Bakterienspezies [137] sowie Bakterienpopulationen aus humanem Speichel [135] eingesetzt. Die Inkubation erfolgt unter Zuführung von Medium durch den Deckel während die Metallscheibe mit den Vertiefungen gedreht wird. Festinstallierte Schaber direkt über der Oberfläche verteilen zum einen das Medium über die Oberfläche in die Vertiefungen und reduzieren bei wachsenden Plaquebiofilmen deren Höhe durch Abscheren nach Erreichen der Höhe der jeweiligen Vertiefung. Mit zunehmender Inkubationszeit bildet sich ein Plaquefilm in den Vertiefungen aus, der die Charakteristika einer im Gleichgewicht befindlichen Plaque zeigt [137]. Nach Inokulation mit Speichelbakterien wurden komplexe Strukturen wie die „corn-cob“-Formationen aus filamentösen und kokkoiden Bakterien sowie eine plaquetypische Bakterienzusammensetzung mit lebenden und in der Tiefe zunehmendem Anteil an toten Bakterien beobachtet [138]. In die Vertiefungen können unterschiedlichste Materialien eingelegt werden bzw. die Pfannen selbst aus dem zu testenden Material gefertigt werden, was a) eine hohe Variabilität der möglichen Testoberflächen und b) einen hohen Probendurchsatz erlaubt. Da der CDFF für die Simulation einer in der Homeostase befindlichen strukturierten Plaque ausgelegt ist, sind die Untersuchungen auf einen längeren Zeitraum ausgelegt (Erreichen des steady state nach ca. 100 h [137]). Nachteilig ist, dass keine online-Analyse der Plaquebildung durchgeführt werden kann. Entsprechend der hohen Variabilität des Systems besitzt der CDFF ein breites Applikationsspektrum. Das System ist für die Testung antimikrobieller Agenzien [137, 139, 140], Untersuchung zur Biofilmstruktur [138], dem Zuckermetabolismus in Plaquebiofilmen [135] sowie zur Testung der Korrosion intraoraler Magneten [141] eingesetzt worden.

### **1.5.3. Artificial Mouth**

Der Begriff des „artificial mouth“, des künstlichen Mundes, wurde von Pigman geprägt [108] und später für entsprechende Kultursysteme übernommen. Die in den 70-iger Jahren entwickelten Varianten beinhalteten Systeme mit Zahnoberflächen, verschiedenen Elektroden und Mono-/Mischkulturen als Inokula [142-145] sowie Systeme mit bis zu sechs Parallelkammern für eine unabhängige Testung der Plaquebildung einschließlich der Nährstoffkontrolle [146]. Die Weiterentwicklung durch Sissons et al. [147] führte zu einem System, das aus einem zylinderförmigen Glasgefäß besteht, in dem sechs separate Plaqueproben (Durchmesser: 8 mm) kultiviert werden können. Für jede Plaqueprobe wurden fünf Ports in das Glasgefäß integriert, die verschiedene Sonden zur Messung unterschiedlicher Parameter (u.a. des pH-Wertes) aufnehmen und die Medienzuführung, Probenahme sowie Probenhalterung in der Mitte des Gefäßes gewährleisten. Die Begasung des autoklavierbaren Systems ist aufgrund der inneren offenen Struktur für alle Proben gleich. Die Temperierung bei 37°C wird durch einen speziell angepassten Inkubator erreicht. Als Substratmaterialien werden verschiedene Polymermaterialien bzw. Zahnschmelzplättchen eingesetzt,

die nach Inkubation mit Speichel eine Pellikelschicht aufweisen und somit naturnahe Oberflächencharakteristiken der Zahnoberflächen der Mundhöhle besitzen. Hierbei sind jedoch die potentiellen Gefahren humanen Materials bezüglich viraler Infektionen zu beachten [148]. Als Inokulum werden frisch präparierte supragingivale Plaqueproben verwendet und mehrfach auf die Probenoberflächen aufgetragen. Zur Inkubation über einen Zeitraum von Tagen bis zu mehreren Wochen wird in regelmäßigen Abständen definiert hergestelltes Medium [149] auf die Proben aufgebracht. Über die angeschlossenen Sonden kann z.B. der pH-Wert direkt auf der Probenoberfläche gemessen werden. Jeder Probenport kann mit einem unterschiedlichen Kultivierungsregime hinsichtlich der Art und zeitlichen Frequenz der Medienversorgung betrieben werden. Der Artificial mouth-Mikrokosmos stellt als in vitro-Modell keine natürliche Plaque mehr dar, aber ist ein sehr nahes, einfacheres und kontrollierbares Abbild [103]. Das Modell weist im Gegensatz zu den anderen Systemen in keiner Phase der Kultivierung eine planktonische Phase auf. Es werden auch keine Scherkräfte z.B. durch Medienbewegungen verursacht.

Alternative Modelle des Artificial mouth basieren auf dem Prinzip des Rotating Disc Reactors, bei dem Scheiben aus Zahnschmelz bzw. Hydroxyapatit über einem Mediumgefäß auf einer Welle gelagert sind und durch Drehung periodisch mit Nährmedium versorgt werden. Beispiele für solche Systeme stellen die Apparatur nach Yankelowitz [150] sowie das Orofax-System von Bibby et al. [151] dar, das für die Untersuchung des Einflusses von Nahrungsmitteln auf die Plaquebildung verwendet wurde. Ein weiteres System wurde von Noorda et al. [152, 153] entwickelt, das eine gesteuerte Medienzuführung besitzt und in ein Fermentergefäß integriert ist. Rotating Disc Reactor-Systeme wurden jedoch auch mit Monokulturen eingesetzt [154] und stellen in diesem Sinn keinen „Mikrokosmos“ dar.

Die Anwendungen des Artificial mouth-Mikrokosmos beinhalten u.a. Untersuchungen zum Zuckermetabolismus in Plaquebiofilmen sowie der Biofilmbildung und Biofilmstruktur [147, 153, 155, 156], dem Harnstoff-Metabolismus und der Calcification [147].

## **1.6. Arbeitsthese**

Für ein in vitro-Prüfsystem der Plaqueadhärenz auf dentalen Materialien im Sinne einer Biokompatibilitätsprüfung gilt es, zwischen der Simulation einer möglichst naturnahen in vitro-Simulation der in der Mundhöhle stattfindenden Plaquebildungsprozesse und einer weitestgehenden Vereinfachung des methodischen Designs abzuwägen. Aufgrund der hohen Bedeutung der initialen Adhäsion dentaler Bakterien für die Plaquebildung und ihrer Beeinflussung durch oberflächenspezifische Materialparameter erscheint eine Methodik auf der Basis definierter und reproduzierbarer Ausgangsbedingungen mit strikter Fokussierung auf die initialen Plaquebildungsprozesse als geeignet, die direkten Effekte der Materialoberfläche eindeutig verifizieren zu können.

Die vorliegende Arbeit soll nachweisen, dass mit Hilfe eines in vitro-Prüfdesigns und eines multimethodischen Analysespektrums initiale Adhäsionsprozesse dentaler Mikroorganismen an Biomaterialien mit hoher Praxisrelevanz der Ergebnisse nachgewiesen werden können. Die Untersuchungen sind dabei strikt darauf ausgerichtet, ein standardisierbares Testverfahren für die Biokompatibilitätsprüfung im Sinne einer schnellen, kostengünstigen und ethisch unbedenklichen Screeningprüfung der Plaqueadhärenz zu entwickeln.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Materialien**

Zur Gewährleistung der klinischen Relevanz der Untersuchungen wurden Materialien der dentalen Praxis eingesetzt. Eine Zusammenstellung ist in Tabelle 1 gegeben. Die Geometrie der Proben ist an die in der Norm DIN 13912 (Immersionstest) genannten Dimensionen angepasst, so dass eine für den Hersteller meist aufwendige Anfertigung von Prüfkörpern mit Sonderabmessungen entfiel. Aus fertigungstechnischen Gründen wurden für Duceragold zylindrische Proben mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Höhe von 1,5 mm verwendet. Die Geometrie der Probekörper wurde je nach Bedarf genau auf die in Tabelle 1 genannten Werte durch Hartmetallfräsen und Schleifen mit Siliziumcarbid-Schleifpapier (SiC) unterschiedlicher Körnung (400, 800, 1200, Fa. Kettenbaum & Joisten) im maschinellen Nass-Schleifverfahren eingestellt (200 U/min). Die für die Adhäsion von Bakterien zur Verfügung stehende Probenoberfläche nach Fixierung in den Fliesskammern (siehe Kapitel 2.5.5.) betrug  $A=2.56 \text{ cm}^2$  (für Duceragold  $A=1,32 \text{ cm}^2$ ). Zur Entfernung von Oberflächenverunreinigungen wurde eine Ultraschallbehandlung vorgenommen. Nach der Oberflächenbehandlung wurden die Probekörper in Ethanol (5 min) und A.dest. (3 min) gewaschen. Anschließend wurden die Probekörper in einer Klimakammer bei 37°C luftgetrocknet und in Fliesskammern fixiert. Die Sterilisation der probenbestückten Fliesskammern erfolgte durch Autoklavierung bei 121°C für 30 min mit anschließender Trocknung bei 60°C in einer Klimakammer. Entsprechend der Problemstellung beinhaltete das Spektrum der Werkstoffe a) Materialien mit unterschiedlichen Oberflächenenergien sowie b) unterschiedlich eingestellten Rauhtiefen.

### **2.2. Einstellung der Oberflächentopografie**

Die vergleichenden Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächentopografie sowie der Oberflächenenergie auf die Bakterienadhäsion erfolgten an den Materialien Titan, Gold und PTFE als Modellwerkstoffe mit jeweils drei Rauigkeitsabstufungen. Durch unterschiedliche Schleif- und Polierverfahren wurden in Abhängigkeit der Materialcharakteristika für jedes Material vergleichbare Rauhtiefenabstufungen eingestellt (Tab. 2).

An Degunorm, Definite, Biosil L und Duceragold als Materialien der dentalen Praxis wurden anschließend validierende Messungen vorgenommen. Die Herstellung der Definite-Proben (Schichtung in Negativform, Aushärtung mittels Polymerisationsleuchte, Anpassung der Geometrie) sowie die Oberflächenbehandlung aller Probekörper erfolgte durch das

Material	Hersteller	Spezifikation/ Zusammensetzung (Massen-%)	Größe [mm]	Anzahl
Titan	Dentaurum J.P. Winkelstroeter KG	c.p., Grad I, gegossen	32x10x1,5	je Material 15 Proben
Gold	DeguDent GmbH	99,99 Au		
Polytetrafluor- ethylen (PTFE)	Hoechst AG	Hostaflon 1645		
Degunorm®	DeguDent GmbH	hochgoldhaltige, keramische Aufbrennlegierung, (Golden Gate System) (73,8 Au, 9,0 Pt, 0,1 Ir, 9,2 Ag, 4,4 Cu, 2,0 Zn, 1,5 % In)		
Biosil® L		Co-Cr-Gusslegierung (62,5 Co, 30,5 Cr, 5,0 Mo, 1,0 Si, 0,4 Mn, 0,3 C, 0,3 N)		
Definite®		ORMOCER®-basierter Kompositwerkstoff (Methacrylsäure-Basis)		
Duceragold®		hydrothermale Verblendkeramik (Golden Gate System)	Ø 15x1,5	

**Tab. 2:** Material und Geometrie der verwendeten Prüfkörper

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Georg-August-Universität Göttingen und stellte somit sicher, dass die erzielten Rauhtiefen der klinischen Praxis entsprechen. Dafür wurden zahntechnisch übliche Polierverfahren eingesetzt (Tab. 3).

Die anhand der Oberflächenbehandlungen erzielten Topografien wurden entsprechend der DIN/EN/ISO 4287 mittels Laser-Rasterprofilometrie quantitativ bestimmt (Laser-Profilometer, UBM Messtechnik GmbH, Ettlingen/Deutschland). Dabei erfolgte eine Flächenmessung auf 1 mm<sup>2</sup> mit 500 P/mm in Meßrichtung und 25 P/mm in Querrichtung. Der Scan wurde bidirektional mit einer Meßfrequenz von 5 P/sec vorgenommen. Die Messwertaufnahme erfolgte in Reflexion. Die Rauheitsparameter  $R_a$  und  $R_{max}$  wurden automatisch aus den Daten der Flächenscans ermittelt.  $R_a$  stellt den Mittenrauhwert dar (arithmetisches Mittel der absoluten Beträge in Richtung der

Material	Oberflächenbehandlung zur Einstellung der Rauhigkeit		
	niedrig	mittel	hoch
Titan	Politur, Diamantpaste (1 µm)	Schliff mit SiC 1200	Schliff mit SiC 120
Gold	Politur, Diamantpaste (1 µm)	Schliff mit SiC 2500	Schliff mit SiC 1200
PTFE	Politur, Diamantpaste (1 µm)	Politur, Diamantpaste (6 µm)	Schliff mit SiC 1200

**Tab. 3:** Oberflächenbearbeitung von Titan, Gold und PTFE für Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächentopografie auf die Bakterienadhäsion

Material	Oberflächenbehandlung
Titan	Vorpolitur (Titanpolierpaste, Fa. Schütz Dental) und Polierbürste Hochglanzpolitur (Hochglanzpolierpaste, Fa. Schütz Dental)
Degunorm	Vorpolitur (Jelenko-Polierpaste, Dental Health Products, USA) Hochglanzpolitur (Hochglanzpolierpaste grün, Fa. Degussa)
Biosil L	Vorpolitur (Vorpoliturpaste rosa, Nr. 508, Fa. Renfert) Hochglanzpolitur (Universalpaste weiss, Nr. 514, Fa. Renfert)
Definite	Vor- und Hochglanzpolitur (Sof-Lex Standard-Scheiben aufsteigender Körnung [mittel, fein, superfein], Fa. 3M) unter Wasserkühlung
Ducragold	Glanzbrand bei 780°C unter Vakuum

**Tab. 4:** Oberflächenbearbeitung von Degunorm, Biosil L, Definite und Ducragold für Untersuchungen der Bakterienadhäsion auf Materialien der dentalen Praxis (Titan als Referenz)

Flächennormalen ausgehend von der Mittellinie innerhalb der Meßstrecke),  $R_{\max}$  ist die maximale gemessene Rauhtiefe innerhalb der Meßstrecke.

Weiterhin erfolgte eine rasterelektronenmikroskopische Analyse der Materialoberflächentopografie. Die Proben wurden nach der Reinigung (siehe Kapitel 2.6.) mit Gold besputtert (Sputter Coater S150B, Edwards High Vacuum International, UK) und bis zur REM-Analyse im Eksikkator gelagert. Die REM-Analysen erfolgte am Rasterelektronenmikroskop Stereoscan 420 (Leica GmbH, Deutschland, 20 KeV).

### 2.3. Bestimmung der Materialoberflächenenergie

Für die Bestimmung des Einflusses der Oberflächenenergie wurde die Oberflächenspannung als Parameter der freien Oberflächenenergie bestimmt. Die Bestimmung erfolgte sowohl an reinen Materialoberflächen wie auch an Oberflächen mit adsorbiertem Albumin. Für die Messung des Einflusses adsorbierender Proteinschichten wurden die Probekörper in eine Albuminlösung (0,9 g/l BSA in A.dest., Fraktion V, Sigma) für 3 h eingelegt und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3x mit PBS (phosphatgepufferte Saline) und 1x mit A.dest. gewaschen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Weiterhin wurde die Kinetik der Adsorption von Albumin anhand der zeitlichen Veränderung der Oberflächenenergie auf Titan, PTFE und Biosil L bestimmt. Die Bestimmung der Oberflächenenergien mit adsorbiertem Albumin erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema jeweils nach zeitlich gestaffelter Albuminapplikation (Adsorptionszeiten: 1 und 10 min, 1, 3 und 24 h). Die Bestimmung erfolgte auf der Basis von Messungen des Kontaktwinkels mittels der Sessile-Drop-Methode. Eingesetzt wurden Standardmessflüssigkeiten (A.dest., Dijodmethan, Formamid, Ethylenglykol). Für die Analyse wurden 10 Tropfen mit je 6 Messwerten je Material und Flüssigkeit am Kontaktwinkelmessgerät (Goniometer G40, Krüss GmbH, Deutschland) vermessen. Die Kalkulation der Oberflächenspannung und ihrer polaren sowie dispersiven Komponenten erfolgte anhand der Methode von Owens & Wendt [157] sowie Kaelble [158].

### 2.4. Mikroorganismen und Medien

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden folgende fünf Bakterienspezies der Mundhöhle verwendet:

- *Streptococcus mutans* (DSMZ 20523)
- *Streptococcus sanguinis* (DSMZ 20068)
- *Actinomyces viscosus* (DSMZ 43329)
- *Fusobacterium nucleatum* (DSMZ 20482)
- *Veillonella parvula* (DSMZ 2007)

Als Kultivierungsmedium wurde ein modifiziertes Basal-Medium (BM) nach McKee et al. [128] mit folgender Zusammensetzung verwendet:

- |                     |                  |
|---------------------|------------------|
| • Proteose-Pepton   | 10,0 g/l (MERCK) |
| • Trypticase-Pepton | 5,0 g/l (Sigma)  |
| • Hefe-Extrakt      | 5,0 g/l (Sigma)  |
| • KCl               | 2,5 g/l (Sigma)  |
| • Cystein-HCl       | 0,5 g/l (Sigma)  |
| • Hämin             | 5,0 mg/l (Fluka) |
| • Vitamin K1        | 1,0 mg/l (Sigma) |
| • Saccharose        | 5,0 g/l (Sigma)  |

Zur Sterilisation des Mediums wurden je 500 ml des Mediums ohne Saccharose bei 121°C für 30 min autoklaviert. Die Zugabe von Saccharose erfolgte durch Sterilfiltration (0,2 µm) nach Autoklavierung. Zusätzlich wurde zur Simulation des Speichel-Proteingehaltes das Medium mit 0,9 g/l Albumin supplementiert (BSA, Fraktion V, Sigma; Sterilfiltration 0,2 µm). Diese Konzentration entspricht dem Durchschnittswert des Proteingehaltes von Speichel [62].

## 2.5. In vitro-Plaquesimulation

### 2.5.1. Bioreaktordesign

Die technische Basis der Plaquesimulation stellte ein Bioreaktor mit sechs unabhängig regelbaren Gefäßen dar (Sixfors, Infors AG, Schweiz, Abb. 3). Das Arbeitsvolumen jedes Bioreaktorgefäßes betrug 500 ml. Jedes Gefäß war mit Sensoren für die automatische Temperatur-, pH- und O<sub>2</sub>-Regelung (Ingold) ausgestattet. Der pH-Wert wurde über reaktorintegrierte Pumpen mit 1 M NaOH und 1 M HCl auf pH=7,2 sowie die Temperatur auf T=37°C über ein Heizmodul an der Aussenseite jedes Gefäßes eingestellt. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte als Suspension im kontinuierlichen Betrieb mit einer Verdünnungsrate von  $D=0,015 \text{ h}^{-1}$  unter anaeroben Bedingungen (Begasung mit einem Stickstoff 95%-Kohlendioxid 5%-Gemisch). Damit konnten die bakteriellen Kulturen stabil in der späten log-Phase inkubiert werden. Die automatische Medienzuführung sowie der Abzug verbrauchten Mediums wurde über Pumpen sichergestellt. Die Rührung bei 100 rpm gewährleistete die homogene Verteilung der Medien sowie der Bakterien. Die Abluft wurde wassergekühlt. Alle offenen Verbindungen zur Umgebung (Probenahme, Druckausgleich, Abluft) wurde durch Sterilfilter (0,2 µm) abgedichtet. Die Bioreaktorgefäße wurden durch Autoklavierung bei 121°C für 60 min im nichtbefüllten Zustand sterilisiert.



**Abb. 3:** Multifermentations-Bioreaktor Sixfors

Für die Plaquesimulationsversuche wurde prinzipiell folgender Arbeitsablauf angewandt:

1. Herstellung einer Vorkultur jedes Bakterienstammes für die Inokulation des Bioreaktorgefäßes (batch-Verfahren)
2. Inokulation eines Bioreaktorgefäßes pro Bakterienstamm und kontinuierliche Langzeit-Kultivierung (Reinkultur)
3. Herstellung einer Mischkultur aus den Reinkulturen in einem weiteren Bioreaktorgefäß und kontinuierliche Kultivierung bis zu 89 h

### **2.5.2. Vorkultivierung**

Die Vorkultivierung erfolgte in 500-ml-Erlenmeyerkolben bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-Begasung für ca. 3 Tage. Lyophilisierte Bakterienpellets aus der Stammhaltung wurden in 1 ml BM-Medium resuspendiert und in 100 ml BM-Medium überführt. Nach ca. 3 Tagen Kultivierung auf einem Schüttler (Aerotron, Infors AG, Schweiz, 100 rpm) wurde bei allen Bakterienspezies eine Bakteriendichte von ca. OD<sub>578nm</sub>=1,8 erreicht (Specord 200, Analytik Jena AG). Die erhaltene Bakteriensuspension wurde direkt für die Inokulation der Bioreaktorgefäße verwendet.

### 2.5.3. Kontinuierliche Reinkulturen

Für die Inokulation eines Bioreaktorgefäßes pro Bakterienstamm wurden die Vorkulturen im Bioreaktorgefäß in BM-Medium auf eine Initial-Bakteriendichte von  $OD_{578nm}=0,3$  verdünnt (Gesamtvolumen pro Gefäß 500 ml). Anschließend erfolgte eine batch-Kultivierung im Bioreaktorgefäß bis eine Bakteriendichte von ca.  $OD_{578nm}=1,8$  erreicht wurde. Entsprechend den Anforderungen oraler Mikroorganismen (anaerobes bis microaerophiles Wachstum) wurden die Bioreaktorgefäße bei 37°C mit einem Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast. Der pH-Wert wurde auf 7,2 automatisch geregelt. Während der Kultivierung wurde durch sterile Probennahme und Trübungsmessung das Wachstum der Bakterienkultur verfolgt sowie mikroskopisch die Kulturen auf Kontaminationen untersucht (BX50, Olympus). Nach Erreichen der vorgegebenen Bakteriendichte erfolgte die weitere Kultivierung im kontinuierlichen Verfahren ( $D=0,015\text{ h}^{-1}$ ). Die kontinuierliche Reinkultur jedes Bakterienstammes diente als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer Mischkultur für Plaquesimulationsversuche. Somit standen zu jeder Zeit Bakteriensuspensionen mit vergleichbarer physiologischer Charakteristik aus der späten log-Phase für die Experimente zur Verfügung.

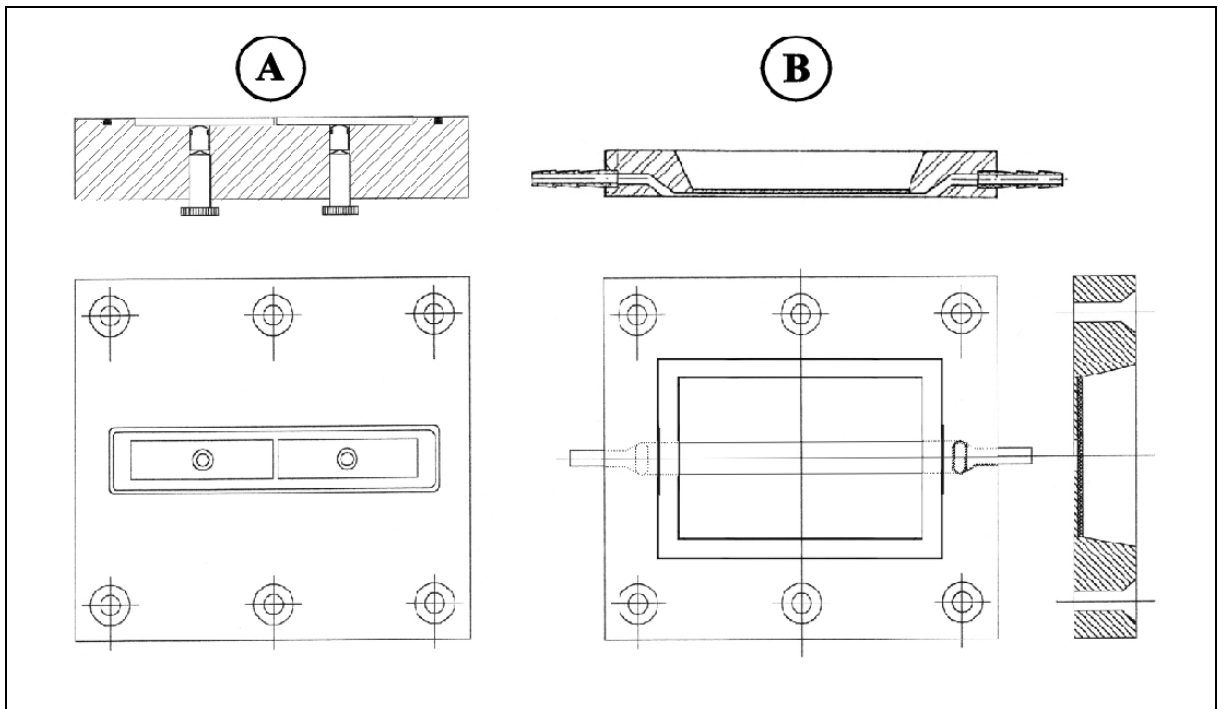
### 2.5.4. Kontinuierliche Mischkultur

Für die Untersuchungen zur Plaqueakkumulation auf den Materialien wurde eine Mischkultur aus allen fünf Bakterienstämmen verwendet. Vor der Herstellung der Mischkultur wurden Proben aus den Reinkulturen gewonnen und quantitativ bestimmt (siehe Kapitel 2.6.5., Fluoreszenzmarkierung). Die Einstellung des quantitativen Verhältnisses der Bakterienspezies erfolgte zu gleichen Anteilen (je  $2 \times 10^6$  Bakterien/ml), um die Konstanz der mikrobiologischen Prüfbedingungen zu gewährleisten. Die eingesetzte Gesamtzahl der Bakterien betrug somit  $1 \times 10^7$ /ml. Das für 500 ml Gesamtarbeitsvolumen im sechsten Bioreaktorgefäß jeweils erforderliche Volumen einer Bakterien-Reinkultur wurde steril mittels geeichtem Zupumpen aus den Reinkulturgefäßen überführt. Die weitere Kultivierung der Mischkultur erfolgte kontinuierlich ( $D=0,015\text{ h}^{-1}$ ) bis zu 89 h unter den in Kapitel 2.5.1. genannten Bedingungen. Nach Versuchsende wurde die Mischkultur verworfen. Durch die Verwendung einer stets frischen bakteriellen Mischkultur für die Untersuchungen war eine deutlich erhöhte bakteriologische Sicherheit bezüglich auftretender Kontaminationen bzw. schwankender Populationsdynamiken gegeben.

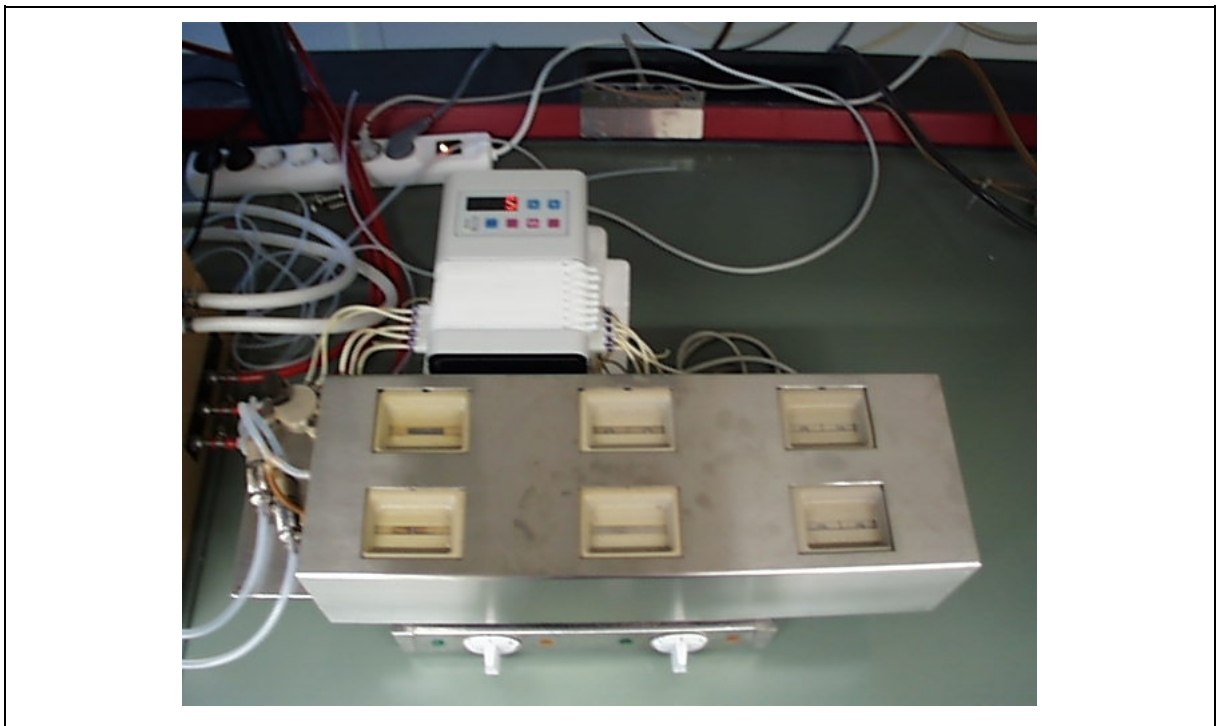
### 2.5.5. Fliesskammerdesign

Zur Prüfung der Plaqueakkumulation wurden die Materialproben in Fliesskammern fixiert (Abb. 4 und 5). Die Fliesskammern sind aus PEEK gefertigt. Dieser Werkstoff erlaubt die Sterilisation durch Autoklavierung bei 121°C und weist eine hohe Langzeitstabilität auf. Die Proben wurden in passgenaue Ausfräsungen der Bodenplatte eingelegt und über Stellschrauben planparallel zum Fliesskanal fixiert. Die Abdichtung des Fliesskanals erfolgte über einen Silikonring in der Bodenplatte. Bei aufgesetzter Deckplatte und Fixierung mittels Schraubverbindungen verblieb ein Fliesskanal von 1 mm Höhe über der Materialprobe. Die Fliesskammern wurden im trockenen Zustand mit den fixierten Materialproben bei 121°C autoklaviert. Um eine hinreichend hohe Probendurchsatzrate zu gewährleisten, wurden 6 Fliesskammern zur parallelen Prüfung von insgesamt 10 Proben eingesetzt (4 Fliesskammern mit je zwei Probekörpern, 2 Fliesskammern mit je einem Probekörper). Die Ankopplung der Fliesskammern an die bakterielle Mischkultur im Bioreaktorgefäß erfolgte über Silikonschläuche und Sterilkupplungen. Dadurch war die Möglichkeit zur sterilen Probenahme sowie zur Vermessung einer Serie von Proben ohne Unterbrechung bzw. Beeinflussung des Inkubationsprozesses im Bioreaktor gegeben. Der kontinuierliche Antransport von Bakterien wurde mit einer Fliessrate von 0,3 ml/min über Pumpen realisiert, so dass aus der im Cross-Flow-Verfahren über die Materialoberfläche strömenden Suspension Bakterien in Abhängigkeit der Materialoberflächenparameter adhärten. Im Fliesskanal der Fliesskammer lag aufgrund der Geometrie und der Fliessrate eine laminare Strömung an (Reynolds-Zahl: 1,1; deutlich unterhalb der kritischen Reynolds-Zahl von ca. 2300 für die Entstehung einer turbulenten Kanalströmung). In Abbildung 6 ist der Geschwindigkeitsverlauf der laminaren Strömung innerhalb des Fliesskanal dargestellt (FEM-Simulation mit laminarem Strömungsmodell, Software MSC MARC). Ein in die Deckplatte integriertes optisches Fenster ermöglichte die online-Kontrolle des Inkubationsprozesses. Die Inkubation erfolgte bis zu 89 h Stunden in einer Temperiereinheit (37°C, Abb. 5), wobei die bakterielle Mischkultur stets in das Bioreaktorgefäß zurückgeführt wurde (abgeschlossenes System). Nach Abbruch der Inkubation wurden die Fließkammern unter sterilen Bedingungen (Laminarflowbox) steril geöffnet, die Materialproben entnommen und entsprechend den in Kapitel 2.6. aufgeführten Methoden analysiert.

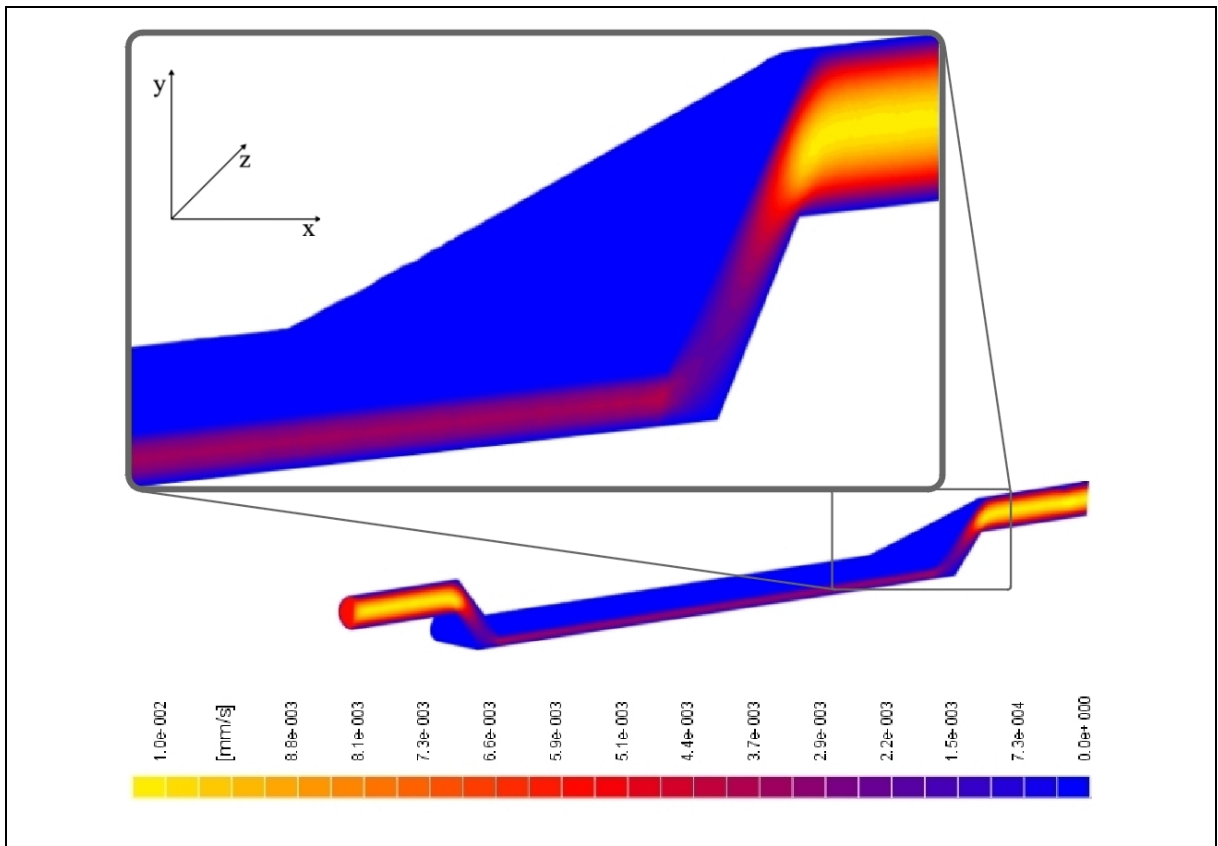




**Abb. 4:** Fliesskammer zur Aufnahme von zwei Materialproben: A) Grundplatte zur Fixierung der Proben mit O-Ring (oben Seitenansicht vorne, unten Aufsicht) B) Deckplatte mit Fliesskanal und optischem Fenster (oben Seitenansicht vorne, unten Aufsicht, rechts Seitenansicht links)



**Abb. 5:** Temperatureinheit mit 6 Fliesskammern



**Abb. 6:** FEM-Simulation der Verteilung der Strömungsgeschwindigkeit (x-Richtung) in dem Fliesskanal

## 2.6. Analytische Methoden

Die Plaqueakkumulation auf den untersuchten Materialien wurde mittels elektronenoptischer, IR-spektroskopischer, fluoreszenzoptischer und quantitativer mikrobiologischer Verfahren analysiert.

### 2.6.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

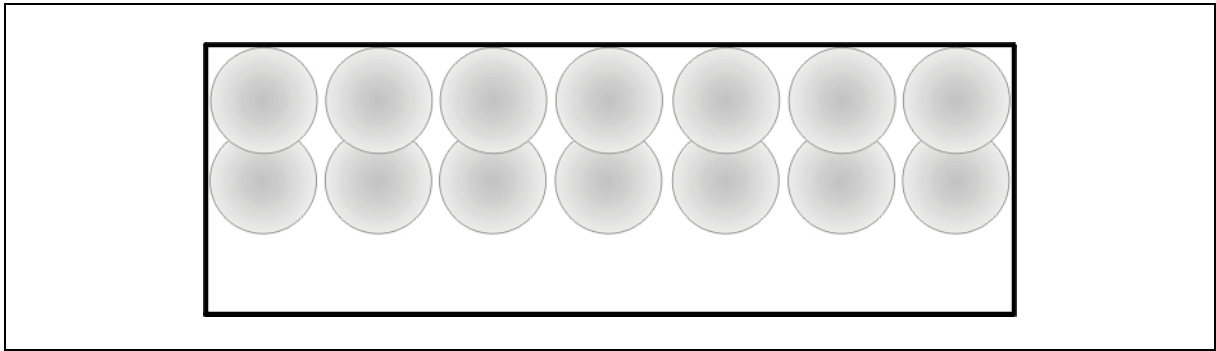
Für die REM-Analyse wurden die Proben aus den Fliesskammern entnommen und zweimal vorsichtig in PBS gespült, um nicht adhärierte Bakterien sowie auf den Proben verbliebene Medienbestandteile zu entfernen. Die Fixierung der Proben erfolgte mit 2,5% Glutaraldehyd und 2%  $\text{OsO}_4$  (jeweils für 20 min bei 4°C mit anschließendem Waschen in PBS). Anschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkohol-Reihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, je 20 min) entwässert und mit Hilfe der Kritischen Punkttrocknung ( $\text{CO}_2$ ) getrocknet (Polaron CPD, Gala Instrumente GmbH, Bad Schwalbach). Nach der Trocknung erfolgte sofort das Besputtern mit Platin bzw. Gold (Sputter Coater S150B, Edwards High Vacuum International, UK). Bis zur REM-Analyse wurden die Proben im Exsikkator gelagert. Die REM-Analysen erfolgte am Rasterelektronenmikroskop Stereoscan 420 (Leica GmbH, Deutschland, 20 KeV). Ausgewertet wurden morphologische Details der akkumulierten Plaqueschichten sowie der Grad der Oberflächenbedeckung (halbquantitativ).

### 2.6.2. Fourier-Transformierte Infrarotmikroskopie (FTIR)

An den Materialoberflächen adhärierte Bakterien wurden anhand des bakterienassoziierten Proteins direkt bestimmt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte analog zur REM-Analyse, jedoch ohne Besputtern. Typische Areale jeder Probe ( $0,38 \text{ mm}^2$ ) wurden im Reflexionsmodus mit dem FTIR-Mikroskop IRscope II und dem FTIR-Spektrometer Equinox 55 (Bruker GmbH, Karlsruhe) analysiert, wobei die Ergebnisspektren die Differenzspektren aus den plaquebesiedelten Proben gegen nichtbesiedelte Kontrolloberflächen darstellen. Für die quantitative Analyse wurden die typischen Amid-Banden bakteriell assoziierter Proteine (Amid I und Amid II im Spektrumbereich von  $1450\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$ ) gefittet und integriert (Software OPUS, Version 4.2). Für den Fit wurden je Spektrum drei charakteristische Amid-Banden bei  $1645 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1590 \text{ cm}^{-1}$  und  $1520 \text{ cm}^{-1}$  (Titan)/ $1450 \text{ cm}^{-1}$  (Gold) als Stützpunkte für den Fit festgelegt. Die anhand der Stützpunkte gefitteten Spektren wurden mittels manuell gesetzter Peakgrenzen (Basislinie) integriert. Die quantitativen Untersuchungen erfolgten an den Modellmaterialien für die vergleichenden Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenenergie und Oberflächentopografie (Titan, Gold). Aufgrund der eingeschränkten Reflexionseigenschaften und der Absorptionseigenschaften für Infrarot-Strahlung an Polymermaterialien konnten die PTFE-Proben nicht vergleichend bewertet werden.

### 2.6.3. Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF)

Mit Hilfe der Laserinduzierten Fluoreszenzdetektion (LIF) wurde an exemplarischen Proben mit unterschiedlicher Oberflächenenergie (Titan, Gold, PTFE; jeweils mittlere Rauigkeit) die Verteilung akkumulierter Plaqueschichten halbquantitativ direkt auf den Materialoberflächen bestimmt. Die messmethodische Grundlage besteht in der Detektion intrazellulärer autogener Fluoreszenzsignale der reduzierten Nicotinsäureamiddinucleotide (NADH). Für die Untersuchungen wurden die Proben direkt nach Inkubation über 89 h aus den Fliesskammern entnommen und mit PBS zur Entfernung nichtadhärierter Bakterien zweimal gespült. Eine Fluoreszenzsonde mit einem Durchmesser von 4 mm koppelte über Lichtleitfasern Laserimpulse der Wellenlänge 337 nm eines gepulsten  $\text{N}_2$ -Lasers in einem definierten Abstand von 2 mm oberhalb der Probenoberfläche ein. Die Detektion der Fluoreszenzintensität bei 465 nm erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor FD-2 (IOM GmbH, Berlin). Die Probenoberfläche wurde durch eine manuelle Sondenpositionierung jeweils an 14 Positionen abgerastert (7 Positionen entlang der Probenmitte, 7 Positionen seitlich, Abb. 7), um das Verteilungsmuster der akkumulierten Plaqueschichten halbquantitativ zu erfassen. Die Fluoreszenzsignale jedes Datenpunktes wurden über 30 Laserimpulse akkumuliert und gemittelt. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten wurden jeweils gegen eine Referenzprobe des jeweiligen Materials ohne adhärierte Bakterien vermessen.



**Abb. 7:** Verteilung der manuellen LIF-Messpunkte auf der Probenoberfläche

#### **2.6.4. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)**

Die CLSM-Technik ermöglicht aufgrund von Tiefenscans in Z-Richtung Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von Biofilmen. An Plaqueschichten auf Titan wurde exemplarisch die Organisation der in der Plaqueschicht aggregierten Bakterien gezeigt. Die auf Titan akkumulierten Plaqueschichten wurden nach der 89 h Inkubation in PBS zweimal vorsichtig gewaschen, um nichtadhärierte Mikroorganismen zu entfernen und anschließend mit dem Fluoreszenz-Kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes, Inc., USA) fluoreszenzmarkiert und am CLSM (TCS SP, Leica, HXC APO L63x/0,9 W U-V-I) detektiert (Z-Scan-Weite 0,5 µm). Mit Hilfe des Fluoreszenz-Kits ist eine selektive Anfärbung lebender und toter Bakterien möglich (Lebendfärbung mittels dem grün-fluoreszierendem SYTO® 9, Totfärbung mittels rot-fluoreszierendem Propidiumjodid). Im Gegensatz zu SYTO® 9, das alle Bakterien der Population markiert, penetriert Propidiumjodid nur in Bakterienzellen mit geschädigten Zellmembranen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass sich alle verwendeten Bakterienspezies mit diesem Kit anfärben ließen. Nach Aufnahme einer Scanserie erfolgte die Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur anhand der Z-Schnittstapel mit der LCS-Software von Leica.

#### **2.6.5. Quantitative Bestimmung der Bakterienzahl**

Die quantitative mikrobiologische Analyse basierte auf der direkten Bestimmung fluoreszenzmarkierter Bakterien am Fluoreszenzmikroskop sowie der Bestimmung der Zahl koloniebildender Einheiten (cfu) auf Selektivagarnährböden.

Zur Entfernung nichtadhärierter Bakterien wurden die Proben nach Entnahme aus den Fliesskammern zweimal vorsichtig in PBS gewaschen. Die Ablösung der Plaqueschichten erfolgte in 1 ml BSA-Saline-Lösung durch Behandlung in einem Ultraschallbad (Sonorex Super 10P, Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin). Die komplette Ablösung wurde durch Auflichtmikroskopie (PME3, Olympus, NeoSPLAN 50 NIC) sowie eine Gegenfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) bzw. LIVE/DEAD® BacLight™ geprüft. Proben mit nicht vollständig abgelösten Plaqueschichten wurden

nicht in die quantitative Auswertung einbezogen. Die Vereinzelung möglicher Bakterienaggregate in den Suspensionen erfolgte mit einem Vortex-Mixer (5 sec).

Für die quantitative Analyse kamen zwei Methoden zum Einsatz:

- Bestimmung der Gesamtbakterienzahl durch Fluoreszenzmarkierung (DAPI-Markierung: Untersuchungen an Titan, Gold und PTFE zum Einfluss der Oberflächenparameter auf die Plaqueadhärenz bzw. Färbung mit LIVE/DEAD® BacLight™: Gesamtbakterienzahl sowie Anteil lebender und toter Bakterien in den Plaqueschichten bei den Untersuchungen zur Systemvalidierung an praxisrelevanten Dentalmaterialien)
- Bestimmung der Zusammensetzung der Plaquepopulationen mittels Selektivagarnährböden (Untersuchungen an Titan, Gold und PTFE zum Einfluss der Oberflächenparameter auf die Plaqueadhärenz)

Für die Analyse der Gesamtbakterienzahl mittels Fluoreszenzmarkierung wurden die Bakterien zur Erhöhung der mikroskopischen Performance direkt nach Ablösung von den Materialoberflächen mit DAPI bzw. LIVE/DEAD® BacLight™ für 5 min angefärbt und in einem Hämocytometer (Thoma, 0.2 mm Tiefe) am Fluoreszenzmikroskop (BX50, Olympus, UPlanFl 40x) gezählt. DAPI wird als Nukleinsäuremarker eingesetzt und färbt alle Bakterien mit intakter Zellmembran. An BacLight-gefärbten Proben erfolgte zusätzlich die selektive Bestimmung des Anteils lebender und toter Bakterien. Die detektierte Bakterienzahl wurde jeweils auf einen cm<sup>2</sup> normiert.

Für die Analyse der Populationszusammensetzung wurden jeweils 100 µl Aliquote der abgelösten Bakteriensuspension in Konzentrationsverdünnungen bis 10<sup>-4</sup> auf Selektivagarnährböden (siehe Tab. 5) ausgestrichen und für 3 Tage bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Die Analyse der Zahl adhärierter Bakterien erfolgte durch Auszählung der koloniebildenden Einheiten (cfu) an einem Stereomikroskop (ST, Optech). Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Daten wurde die Bakterienzahl pro cm<sup>2</sup> Probenfläche berechnet.

Für die Durchführung von Parallelversuchen zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden die Probematerialien nach Ablösung der Bakterien nochmals durch ein Ultraschallbad gereinigt, in Ethanol (5 min) und A.dest. (3 min) gewaschen, und in einer Klimakammer bei 37°C luftgetrocknet. Vor jeder Paralleluntersuchung erfolgte eine erneute Sterilisation durch Autoklavierung bei 121°C für 30 min.

Bakterienspezies	Selektivagar-Zusammensetzung	Menge
<i>Streptococcus spec.</i>	MS-Agar (Mitis-salivarius-Agar) Bacitracin	90 g/l 0,1 U/ml
<i>Actinomyces viscosus</i>	CFAT-Agar (Cadmium-Fluoride-Acriflavin-Tellurite-Agar) TSB Glucose Agar Cadmium-Sulfat Na-Fluorid Acriflavin, neutral Kaliumtellurit Fuchsin, basisch Pferdeblut	 30 g/l 5 g/l 15 g/l 13 mg/l 80 mg/l 1,2 mg/l 2,5 mg/l 0,25 mg/l 5% (v/v)
Gramnegative Bakterien	Blut-Agar (Basis) Nr.2 Vancomycin Pferdeblut	12,7 g/ 2,5 mg/l 7% (v/v)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Blut-Agar (Basis) Nr.2 Kristall-Violett Erythromycin	12,7 g/l 5 mg/l 4 mg/l
<i>Veillonella parvula</i>	Rogosa-SL-Agar	75 g/l

**Tab. 5:** Verwendete Agarnährböden zum selektiven Nachweis der fünf Bakterienspezies

### 2.6.6. Statistische Analyse

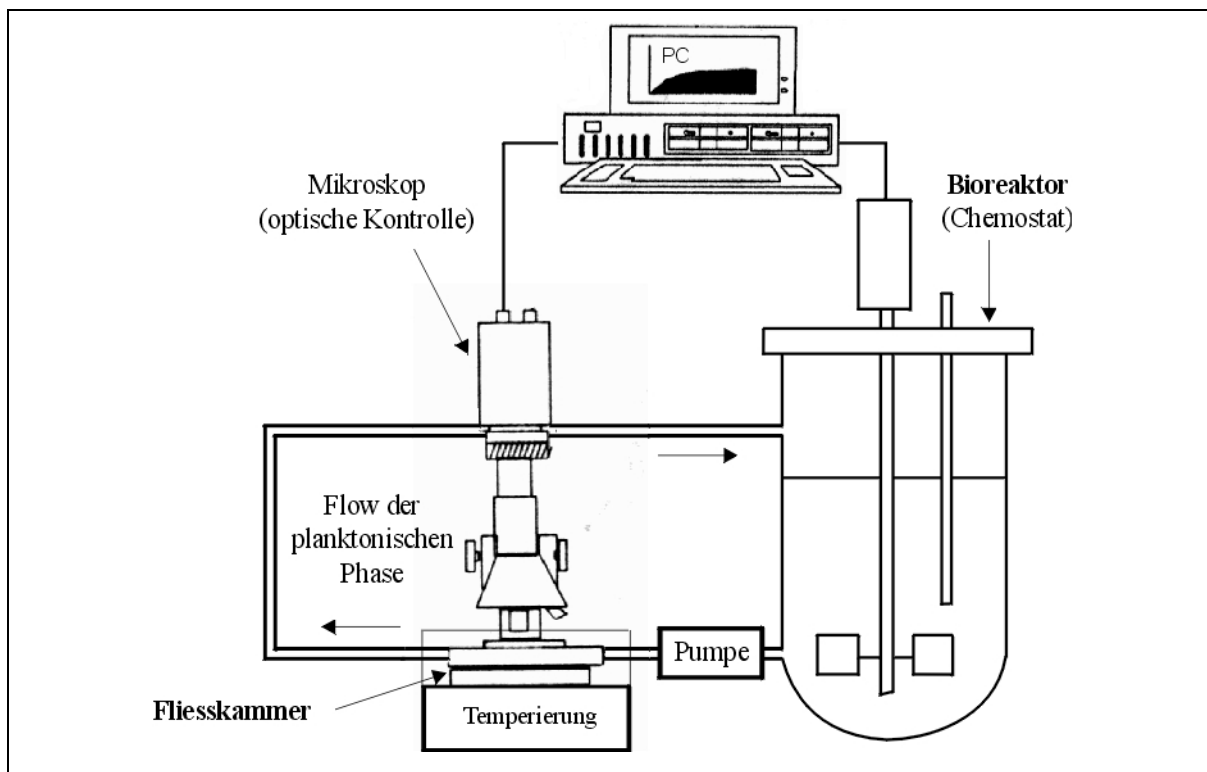
Die quantitativen Daten der mikrobiologischen Analyse wurden statistisch anhand folgender Methoden evaluiert:

- Ausreissertest nach Grubbs und anschließend
- Kruskal-Wallis-Test

Der Grubbs-Test eliminiert Ausreisser-Werte ausgehend vom gesamten Datensatz aller Tests. Er basiert auf der Annahme einer Normalverteilung der Grundgesamtheit. Anhand einer Prüfgröße, die sich aus der Differenz des Mittelwertes und des zu prüfenden Messwertes dividiert durch die Standardabweichung berechnet, wird der Abstand des ausreisserverdächtigen Messwertes zum Mittelwert mit Bezug auf die Standardabweichung bestimmt und anhand eines festzulegenden Niveaus gewertet [159].

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier Test zur Prüfung der Signifikanz mehrerer unabhängiger Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz, durch den festgestellt wird, ob die Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen oder lediglich zufällig voneinander abweichen [160]. Er stellt eine Erweiterung des Wilcoxon-Tests für mehr als zwei Stichproben dar. Die Daten aller  $k$  Stichproben werden in eine Rangordnung gebracht, und die Rangplatzsummen ( $R_i$ ) der einzelnen Stichproben verglichen. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Testes wurde die Signifikanz der Unterschiede der Plaquebesiedelung in Abhängigkeit der Oberflächentopografie bzw. Oberflächenenergie der Materialien untersucht (Signifikanz-Niveau  $p < 0,05$ ). Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS for Windows (Rel. 9.0.1.) vorgenommen.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen eine zusammenfassende Übersicht der in vitro-Plaqueprüfung sowie der Analyse akkumulierter Plaqueschichten.



**Abb. 8:** Schema der in vitro-Plaqueprüfung auf der Basis eines Chemostaten mit angekoppelter Fliesskammer



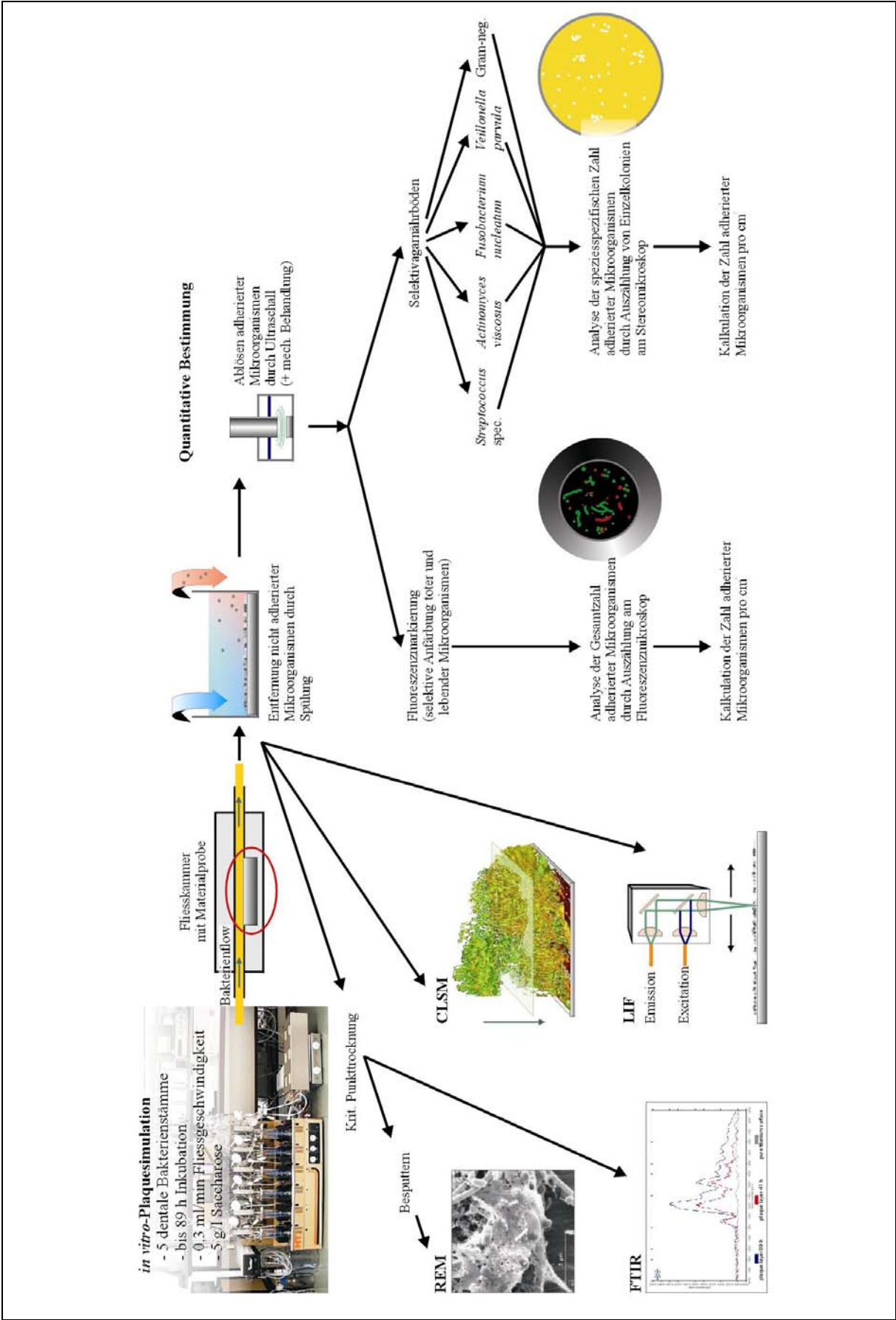


Abb. 9: Schema der in vitro-Analyse der Plaqueadhärenz

### 3. Ergebnisse

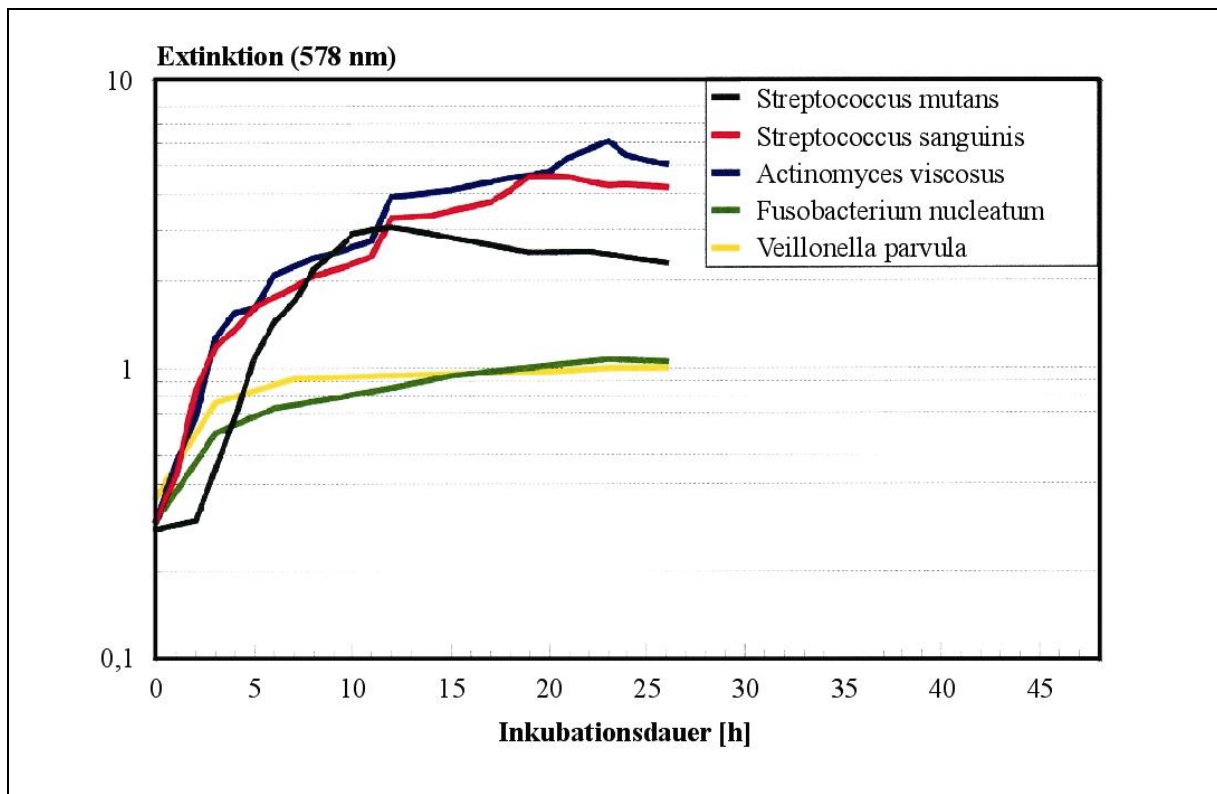
#### 3.1. Bakterielle Wachstumskinetik in BM-Medium

Für die Stabilität einer bakteriellen Mischkultur in einer kontinuierlichen Bioreaktorkultivierung ist die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  jeder einzelnen Bakterienspezies unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen sehr wichtig. Ist die Wachstumsrate einer (oder mehrerer) Bakterienspezies bei gegebener Verdünnungsrate deutlich niedriger als die weiterer Spezies, so tritt im Laufe der Kultivierung eine Verdünnung einzelner Bakterienspezies auf und verändert so die Applikation einer reproduzierbaren Mischpopulation. Aufgrund der Interaktionen zwischen einzelnen Bakterienspezies bei der Bildung von Plaqueschichten kann dies Auswirkungen auf eine in vivo-nahe Simulation der Plaquebildung haben. Daher wurden in Vorversuchen die Wachstumsraten der eingesetzten Bakterienspezies bei Kultivierung in BM-Medium ermittelt. Die Wachstumsrate  $\mu$  einer Bakterienkultur kann aus dem Anstieg der Wachstumskurve in der exponentiellen (logarithmischen) Wachstumsphase bei halblogarithmischer Auftragung der optischen Dichte OD bei 578 nm gegen die Kultivierungszeit nach folgender Formel errechnet werden:

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{(t - t_0)} \quad \text{Wachstumsrate einer Bakterienkultur}$$

Zur Aufnahme der Wachstumskurven wurden jede Stunde eine Probe steril aus Reinkulturen der Bakterienspezies in BM-Medium entnommen und die optische Dichte bestimmt. In Abb. 10 sind die ermittelten Wachstumskinetiken für die untersuchten Bakterienspezies in BM-Medium und in Tab. 6 die ermittelten durchschnittlichen Wachstumsraten aufgeführt.

Die Wachstumskinetiken zeigten, dass der Anstieg in der logarithmischen Wachstumsphase und somit die Wachstumsraten aller verwendeten Bakterienstämme in BM-Medium hinreichend vergleichbare Werte aufwiesen. Der Ertrag  $X_{\max}$  bei den strikt anaeroben Stämmen *Fusobacterium nucleatum* und *Veillonella parvula* war jedoch geringer als bei den drei weiteren Bakterienstämmen. Auf der Basis der Befunde wurden für das Testdesign wichtige Konsequenzen definiert:



**Abb. 10:** Wachstumskinetiken der verwendeten Bakterienspezies in BM-Medium

Mikroorganismus	Wachstumsrate $\mu$ [h <sup>-1</sup> ]
<i>Streptococcus mutans</i>	0,294
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,281
<i>Actinomyces viscosus</i>	0,204
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,249
<i>Veillonella parvula</i>	0,228

**Tab. 6:** Durchschnittliche Wachstumsraten der untersuchten Bakterienspezies in BM-Medium

- Die kontinuierliche Kultivierung von Reinkulturen aller fünf Bakterienstämme sichert eine stets ausreichende Zahl von Bakterien zur Inokulation von Mischkulturen für die Plaquesimulation.
- Die annähernd gleichen Wachstumsraten der Bakterienspezies in BM-Medium ermöglichen in erster Näherung eine stabile Bakterienmischkultur im Bioreaktor mit gegebener Verdünnungsrate.
- Durch die Kultivierungsdauer der Mischpopulationen bis maximal 89 Stunden werden Populationsveränderungen aufgrund leichter bakterienspezifischer Unterschiede der Wachstumsrate während der kontinuierlichen Kultivierung minimiert.
- Anhand der ermittelten Wachstumsraten wurde eine Verdünnungsrate  $D=0,015 \text{ h}^{-1}$  ermittelt (Substratkontrolle des Chemostaten durch limitierte Nährstoffzufuhr).

### 3.2. In vitro-Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenenergie und-topografie auf die Plaqueadhärenz

#### 3.2.1. Materialoberflächentopografie

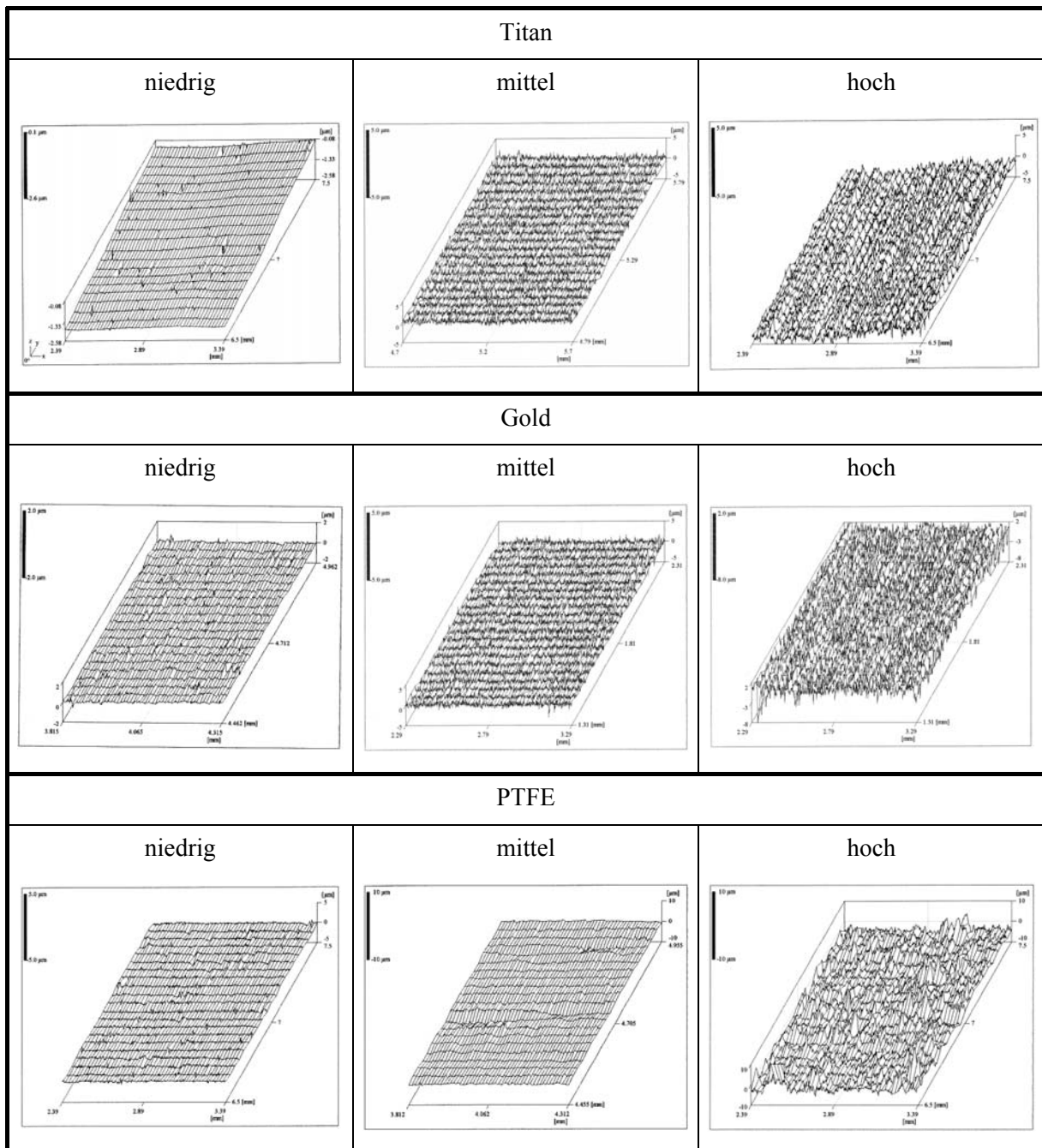
Mit Hilfe der zur Oberflächenbehandlung der verschiedenen Festkörperstrukturen von Titan, Gold und PTFE eingesetzten Schleif- und Polierverfahren (siehe Tab. 3) konnten graduelle, vergleichbare Rauigkeitsabstufungen eingestellt werden, die die Basis für die vergleichende Bewertung des Einflusses der Oberflächentopografie auf die Plaquebildung darstellen. In Tabelle 7 sind die mittels Laserprofilometrie quantifizierten  $R_a$ -Werte sowie in Abb. 11 die Flächenscans aufgeführt. Die originären Oberflächenstrukturen wurden durch die REM-Analyse dokumentiert (Abb. 12). Auf den geschliffenen Probenoberflächen sind deutlich gerichtete Schleifspuren zu erkennen. Die polierten Oberflächen zeigen eine einheitliche, sehr glatte Oberfläche.

Material	niedrig		mittel		hoch	
	$R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_{\text{max}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_{\text{max}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_{\text{max}}$ [ $\mu\text{m}$ ]
Titan	0,04	0,11	0,39	3,37	0,64	4,79
Gold	0,08	0,52	0,39	2,82	0,90	6,81
PTFE	0,12	1,44	0,27	1,44	0,79	5,10

**Tab. 7:** Rauigkeit von Titan, Gold und PTFE für Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächentopografie auf die Bakterienadhäsion

#### 3.2.2. Materialoberflächenenergie

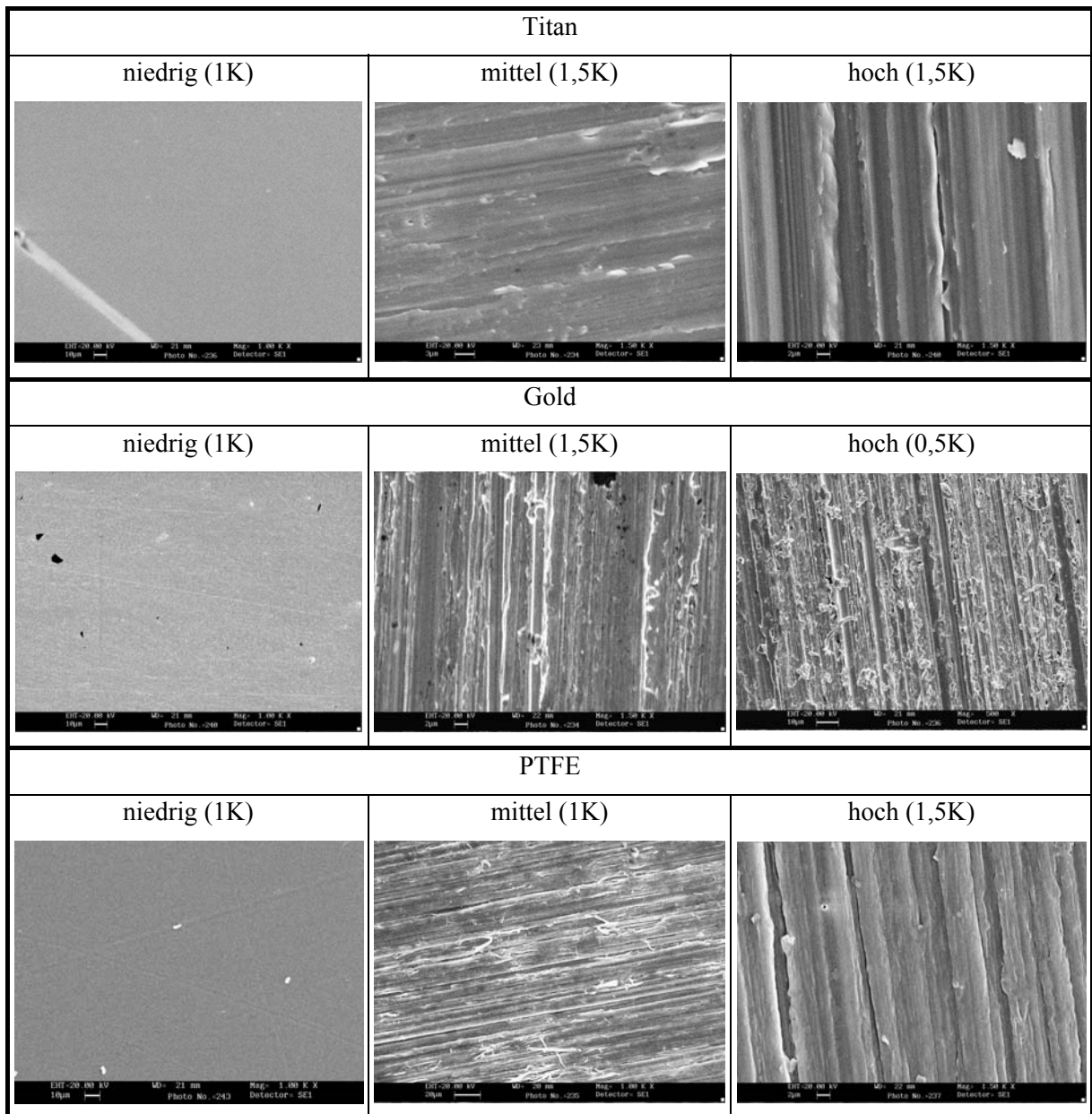
Für die vergleichende Bewertung des Einflusses oberflächenenergetischer Materialparameter auf die Plaqueadhärenz wurden auf der Basis der Kontaktwinkelmessung mit Flüssigkeiten der homologen Reihe (Tab. 8) die Materialien physikochemisch charakterisiert. Die angewandten physikalischen Modelle zur Erfassung der Oberflächenenergie und deren dispersiver und polarer Komponenten setzen in der Regel eine homogene und ebene Materialoberfläche voraus. Da die Durchführung der Kontaktwinkelmessung an Oberflächen höherer Rauigkeit sowie die Interpretation der Ergebnisse aufgrund unvollständiger theoretischer Modellierungen nicht unproblematisch ist [16, 161, 162], erfolgte die oberflächenenergetische Charakterisierung an polierten Probenoberflächen. Die auf der Basis der Kontaktwinkel ermittelten energetischen Parameter der Materialien sind in Tab. 9 aufgeführt.



**Abb. 11:** Flächenscans der Materialien Titan, Gold und PTFE mittels Laserprofilometrie

Sie bilden die Grundlage zur Beurteilung von Korrelationen mit den mikrobiologischen Testergebnissen.

Aus den Daten wird deutlich, dass für die vergleichenden Untersuchungen aus oberflächenenergetischer Sicht Materialien aus zwei Gruppen eingesetzt wurden: die Metalle Titan und Gold mit hoher Oberflächenenergie und Polarität sowie das Polymer PTFE mit ausgeprägten hydrophoben, unpolaren Eigenschaften. Die oberflächenenergetischen Unterschiede zwischen den Materialien werden jedoch durch die Adsorption von Albumin an den Materialoberflächen nach Kontakt des BM-Mediums mit den Materialoberflächen modifiziert. Dies führt, wie in den Tabellen



**Abb. 12:** Oberflächenstruktur der präparierten Materialoberflächen von Titan, Gold und PTFE in Abhängigkeit von der eingestellten Rauigkeitsabstufung (REM)

10 und 11 sowie den Abbildungen 13 und 14 gezeigt, zur Veränderung der Oberflächenparameter. Die Oberflächenspannung nimmt bei Titan und Gold ab, bei PTFE wird sie größer. Dies führt zur Angleichung, wenn auch nicht zur vollständigen Nivellierung der Unterschiede der reinen, unmodifizierten Materialoberflächen. Die Adsorption von Albumin während des Inkubationsprozesses führt sozusagen zu einer partiellen Maskierung der Oberfläche. Jedoch bleiben die hydrophoben Eigenschaften des Polymers im Vergleich zu den metallischen Werkstoffen, wenn auch auf einem geringeren Niveau, erhalten. Der polare Anteil der Oberflächenspannung weist eine moderate Erhöhung bei Titan auf sowie eine Verringerung bei Gold. Bei PTFE steigt die Polarität deutlich an. Im Rahmen einer Fehlerbetrachtung können für die zugrundeliegende Messmethodik (Kontaktwinkelbestimmung mit anschließender Berechnung der Oberflächenspannung und Polarität

nach den Methoden von Owens & Wendt sowie Kaelble; siehe 2.3.) grundsätzliche Schlussfolgerungen gezogen werden. Da die Oberflächenspannung sowie Polarität über eine lineare Regression von aus den Mittelwerten der Kontaktwinkel der Messflüssigkeiten abgeleiteten Werten ermittelt werden (4 Flüssigkeiten = 4 Stützstellen), entfällt die Angabe von Standardabweichungen für diese Parameter. Im Prinzip werden die Fehler der Oberflächenspannung sowie Polarität von der Streuung der Werte für die Kontaktwinkel sowie der Güte der linearen Regression bestimmt. Varianzen der Kontaktwinkel von bis zu 5 Grad aufgrund systematischer Fehler (Optik der Kontaktwinkelmessung, Oberflächentopografie, Temperaturschwankungen, Verdunstung) stellen eine allgemein akzeptierte Fehlerstreuung dar. Weiterhin wurden für die lineare Regression der nach Owens & Wendt abgeleiteten Werte Regressionskoeffizienten von 0,72 bis 0,92 für die reinen, unmodifizierten Oberflächen bestimmt. Die angegebenen Werte für die Oberflächenspannung und Polarität besitzen daher eine ausreichend hohe Genauigkeit. Für die Oberflächen mit adsorbiertem BSA sind die Regressionskoeffizienten deutlich niedriger, da insbesondere der mittlere Kontaktwinkel für Formamid nicht mehr einer linearen Beziehung folgt. Für die Auswertung einer solchen nichtlinearen Beziehung ist im Prinzip ein noch nicht existierendes modifiziertes physikalisches Modell anzuwenden. Daher wurde auch für die BSA-beladenen Oberflächen die Auswertung nach Owens & Wendt gewählt, was einerseits die Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet, jedoch mit einer höheren Fehlerwahrscheinlichkeit für die Oberflächenspannung und Polarität auf proteinbeladenen Oberflächen verbunden ist.

Die Diversität der oberflächenenergetischen Parameter und der eingestellten Topografien stellte die methodische Grundlage für den Nachweis der Eignung des in vitro-Testsystems als Screening-Methode für die vergleichende Bewertung des Einflusses von Oberflächenparametern auf die Plaquebildung dar.

Material	A.dest.	Ethylenglycol	Dijodmethan	Formamid
Titan	$50,1 \pm 3,0$	$35,3 \pm 2,6$	$43,5 \pm 3,5$	$37,3 \pm 2,2$
Gold	$66,7 \pm 2,7$	$38,5 \pm 2,9$	$42,1 \pm 2,7$	$41,8 \pm 2,1$
PTFE	$98,7 \pm 2,4$	$79,8 \pm 2,4$	$89,2 \pm 2,4$	$93,5 \pm 3,1$

**Tab. 8:** Kontaktwinkel der Testflüssigkeiten auf Titan, Gold und PTFE [°] Die Bestimmung der Kontaktwinkel erfolgte an den Proben mit niedriger Rauigkeit.

Material	Oberflächen- spannung [mN/m]	dispersiv [mN/m]	polar [mN/m]	Polarität [%]
Titan	49,3	34,1	15,2	30,8
Gold	45,8	37,5	8,3	18,1
PTFE	16,2	13,1	3,1	19,1

**Tab. 9:** Kalkulation der oberflächenenergetischen Parameter von Titan, Gold und PTFE auf der Basis der Kontaktwinkel

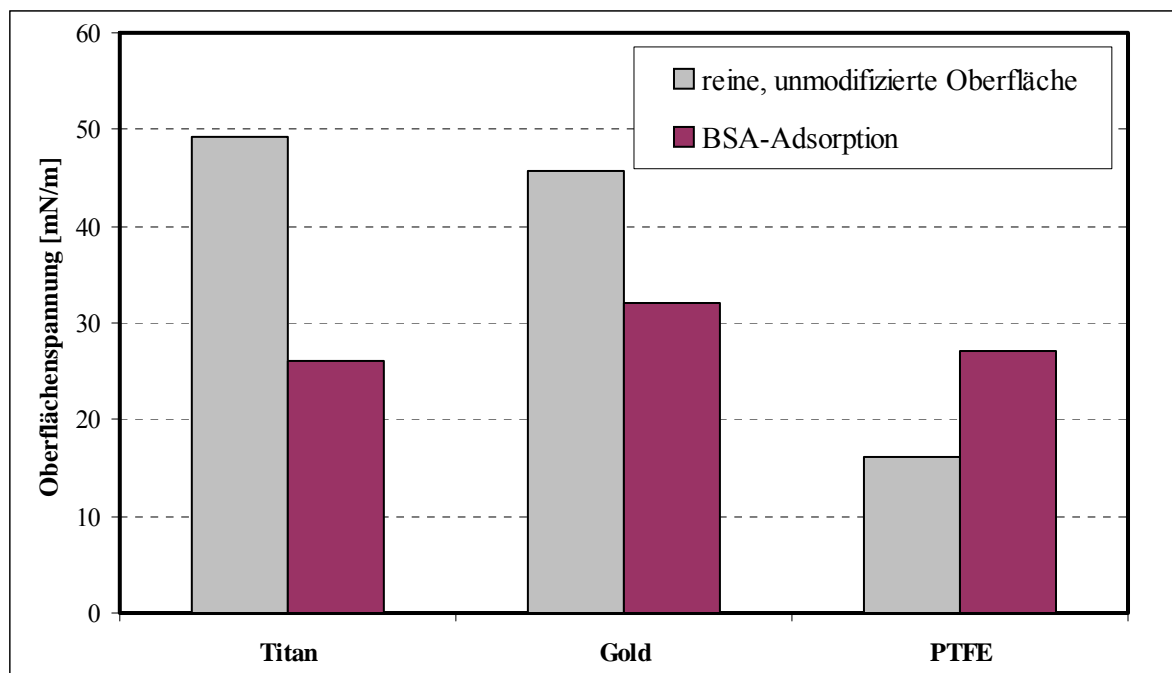
Material	A.dest.	Ethylenglycol	Dijodmethan	Formamid
Titan	$88,9 \pm 2,1$	$50,4 \pm 3,9$	$46,9 \pm 1,9$	$89,3 \pm 0,8$
Gold	$87,6 \pm 0,9$	$46,8 \pm 5,3$	$54,5 \pm 0,6$	$77,5 \pm 3,0$
PTFE	$88,0 \pm 3,1$	$45,9 \pm 1,9$	$46,9 \pm 2,5$	$87,5 \pm 2,8$

**Tab. 10:** Kontaktwinkel der Testflüssigkeiten auf Titan, Gold und PTFE mit adsorbiertem Albumin [°]

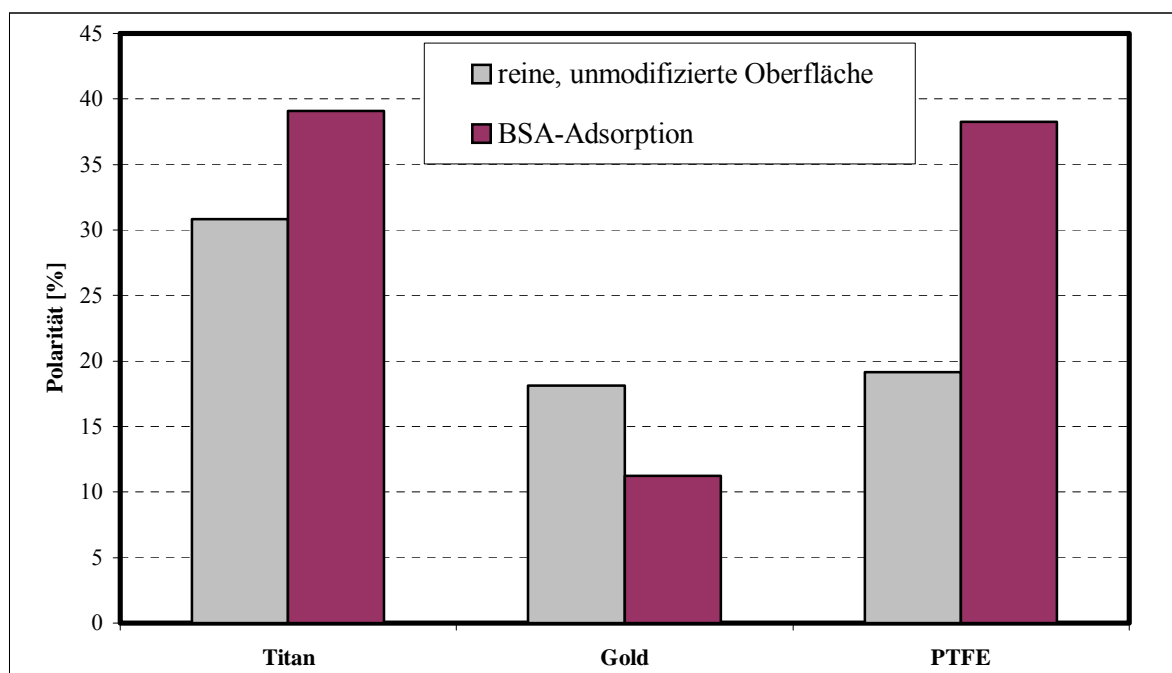
Material	Oberflächen- spannung [mN/m]	dispersiv [mN/m]	polar [mN/m]	Polarität [%]
Titan	26,1	15,9	10,2	39,1
Gold	32,0	28,4	3,6	11,3
PTFE	27,2	16,8	10,4	38,2

**Tab. 11:** Effekt der Albuminadsorption auf die Materialoberflächenenergie und Polarität





**Abb. 13:** Oberflächenspannung der reinen, unmodifizierten Materialoberflächen von Titan, Gold und PTFE im Vergleich mit Albumin-adsorbierten Oberflächen



**Abb. 14:** Polarität der reinen, unmodifizierten Materialoberflächen von Titan, Gold und PTFE im Vergleich mit Albumin-adsorbierten Oberflächen

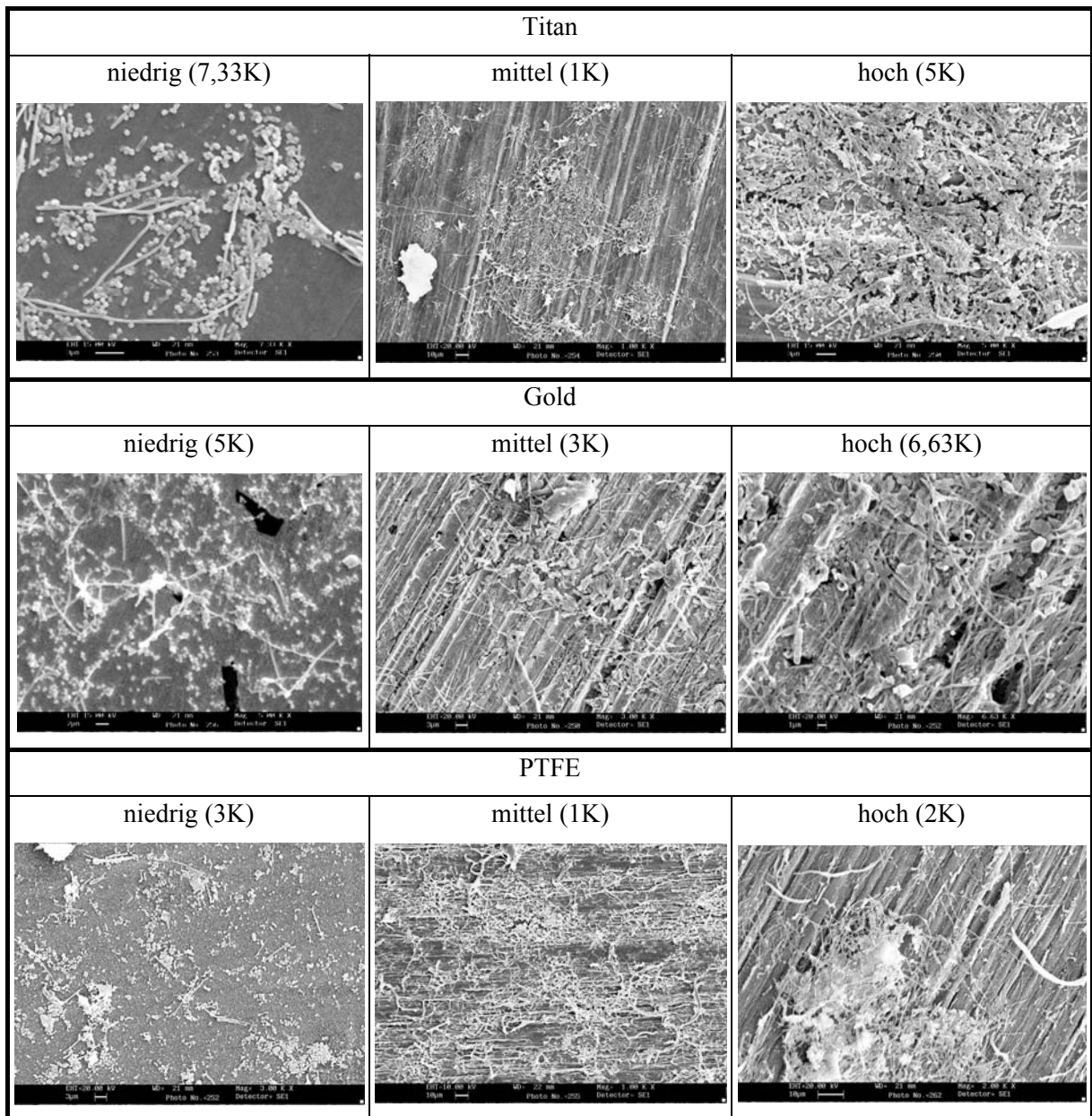
### 3.2.3. REM

Die Analyse akkumulierter Plaqueschichten mittels REM erlaubt einen halbquantitativen Vergleich der Plaquebesiedelung auf den Materialproben nach Inkubation. Die Methodik ist jedoch insbesondere für die Korrelation der Plaquebesiedelung mit oberflächentopografischen Strukturen geeignet. Aufgrund der methodenbedingten Trocknung der Proben sind jedoch Rückschlüsse auf die Struktur der akkumulierten Plaqueschichten nur bedingt möglich.

Die vergleichenden REM-Aufnahmen von Proben nach 89 h Inkubation zeigen, dass eine Abhängigkeit der Plaqueakkumulation von der Oberflächenrauigkeit besteht. Auf Proben mit niedrigen Rauigkeiten adhären die geringsten Mengen an Plaquebakterien. Mit zunehmender Rauigkeit steigt die Zahl der an der Oberfläche adhärenen Bakterien unabhängig vom Material (Abb. 15), wobei hier nur eine grobe, phänomenologische Quantifizierung erfolgen kann.

Der Vergleich akkumulierter Plaquebakterien auf den verschiedenen Materialien (bei jeweils vergleichbarer Rauigkeit) zeigt weiterhin eine Abhängigkeit der Plaqueadhärenz von der Oberflächenenergie. Die Plaquebildung auf der niedrigenergetischen Oberfläche des PTFE ist geringer als auf den hochenergetischen Titan- und Goldoberflächen. Ansammlungen adhärenter Bakterien auf PTFE, wie sie in Abb. 15 dokumentiert sind, treten nur an distinkten Stellen auf, was durch Scans über die PTFE-Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Weite Bereiche der Oberfläche sind dagegen nahezu bakterienfrei. Beim direkten Vergleich zwischen Titan und Gold ist eine Tendenz zur stärkeren Akkumulation auf Titan zu erkennen, wobei jedoch die Titan-Proben eine höhere Streuung aufweisen. Auf Gold ist die Verteilung der adhärenen Bakterien homogener als bei Titan. Auf der Titanoberfläche wechseln sich Stellen sehr dichter Plaquebesiedelung mit Stellen geringerer Bedeckung ab.

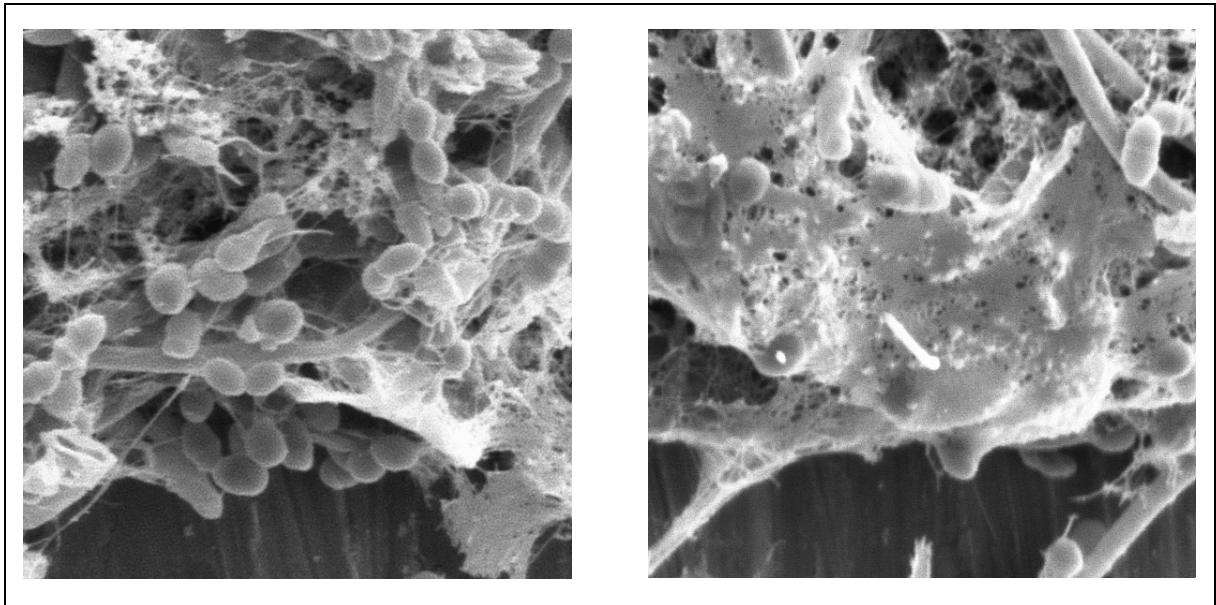
Anhand der visuellen Begutachtung ist auf den rauen Oberflächen der Anteil an Fusobakterien tendentiell etwas höher, als im Vergleich mit den Oberflächen niedriger Rauigkeit. Dieser Befund kann in Coadhäsionsprozessen auf Oberflächen mit erhöhter Bakterienbesiedlung begründet sein. In Abbildung 16 (links) sind auch Ansätze von „corncob“-Strukturen von Fusobakterien mit Kokken zu erkennen, was als Zeichen einer interaktiven Kommunikation zu werten ist. Das für in vivo-Plaqueschichten typische Auftreten extrazellulärer Matrixsubstanzen ist in Detail-Aufnahmen akkumulierter Plaqueareale auf Titan zu erkennen (Abb 16, rechts). Die mehrschichtigen bakteriellen Plaquepopulationen (Abb. 17) sind in ein Geflecht bakteriogener extrazellulärer Polysaccharide eingebettet. Die zu erkennende Struktur der EPS besitzt aufgrund des Trocknungsverfahrens Artefaktcharakter. Jedoch lassen sich daraus Rückschlüsse auf die Funktionalität und Aktivität der im in vitro-Versuch akkumulierten Plaqueschichten ziehen, die auf eine hohe in vivo-Relevanz der in vitro-Plaquesimulation hinweisen.



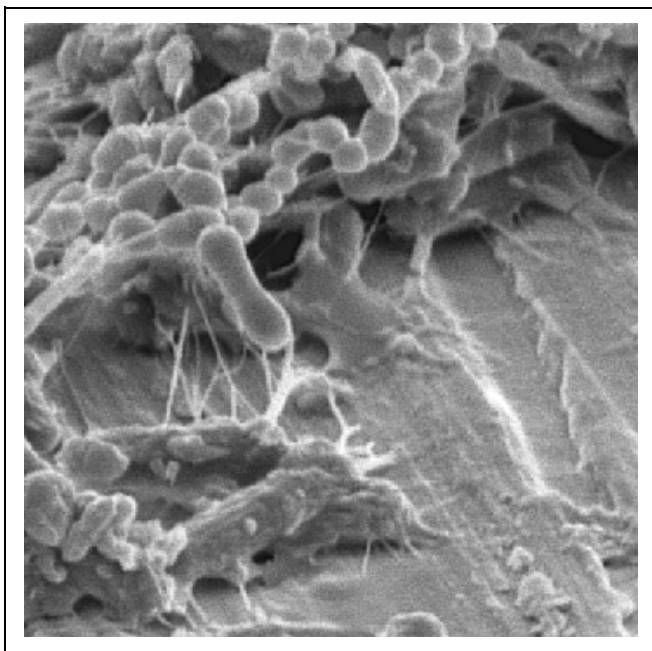
**Abb. 15:** Adhärerte Plaquebakterien auf Titan, Gold und PTFE in Abhängigkeit der Oberflächentopografie (REM)

### 3.2.4. FTIR-Mikroskopie

Die Detektion akkumulierter Bakterien mit Hilfe FTIR-spektroskopischer Verfahren direkt auf den Probenoberflächen wird u.a. für die Analyse der Biofilmkinetik eingesetzt [163, 164]. Anhand der proteinspezifischen IR-Absorption der Amidbindungen sowie einem Banden-Fit der Amid-I- und Amid-II-Banden sind quantitative Aussagen zur Menge akkumulierter Plaqueschichten möglich. An exemplarischen Titan- und Gold-Proben wurden entsprechende FTIR-mikroskopische Untersuchungen nach Inkubation (89 h) vorgenommen, um die prinzipielle Eignung der Methodik für eine halbquantitative Auswertung der Plaqueadhärenz zu zeigen. Die aus den Amid-Peaks der Spektren (Abb. 18 und 19) ermittelten quantitativen Daten konnten die Korrelation der Rauigkeit mit

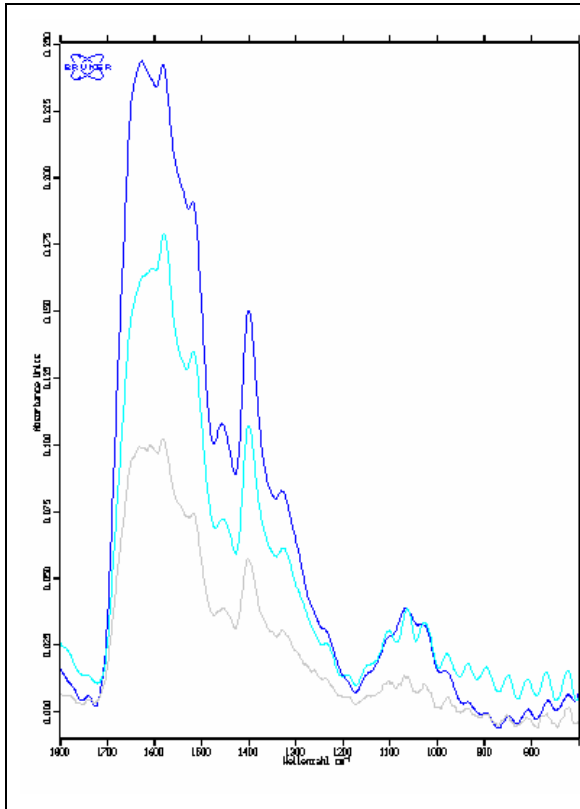


**Abb. 16:** Kokken und Fusobakterien auf Titan, eingebettet in einer EPS-Schicht und Ausbildung von „corncob“-ähnlichen Strukturen (REM, 10K)

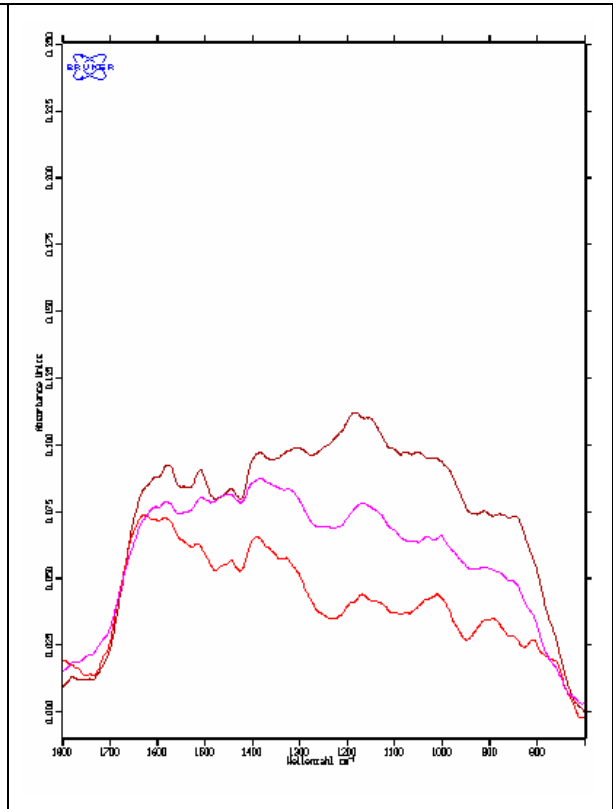


**Abb. 17:** Mehrschichtige Plaquestruktur aus Kokken, Actinomyceten und Fusobakterien auf Titan nach 89 h Inkubation (REM, 10K)

der Plaqueadhärenz bestätigen. Die quantitative Analyse des Proteingehaltes nach Banden-Fit der Amid-Peaks zeigt eine steigende Plaqueakkumulation mit zunehmender Rauigkeit (Tab. 12). Im Vergleich mit Gold adhären auf Titan demnach mehr Bakterien. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Plaqueadhärenz auf beiden Materialien mit niedriger Rauigkeit gezeigt werden. Die bei Gold detektierte, über einen weiten Bereich reichende Absorption (Abb. 19), deutet auf eine ausgedehnte Matrixsynthese hin. Kohlenhydrate spielen hierbei eine wichtige Rolle. Die kohlenhydratspezifischen Absorptionsbanden sind im IR-Spektrum weit verteilt und führen letztendlich bei einem Multikomponentensystem, wie im Fall der Plaqueschicht, zu einer



**Abb. 18:** FTIR-Spektrum akkumulierter Plaque-schichten auf Titan in Abhängigkeit der Oberflächentopografie (grau: niedrige Rauigkeit, hellblau: mittlere Rauigkeit, blau: hohe Rauigkeit)



**Abb. 19:** FTIR-Spektren akkumulierter Plaque-schichten auf Gold in Abhängigkeit der Oberflächentopografie (rot: niedrige Rauigkeit, violett: mittlere Rauigkeit, braun: hohe Rauigkeit)

Überlagerung von Einzelbanden mit einem typischen Verlauf, wie er für die Spektren auf der Goldoberfläche beobachtet wurde.

Die Auswertemethodik basiert auf einer manuellen Auswahl repräsentativer Oberflächenareale. Die Güte der Quantifizierung sowie die Vergleichbarkeit der Daten wird dabei durch die Festlegung der Stützstellen für den Spektrenfit bestimmt. Sie ist ausreichend hoch, wenn an den ausgewählten Stützstellen die Peaks in den einzelnen Spektren keinen Shift aufweisen, was u.a. durch eine äußerst genaue, reproduzierbare Probenvorbereitung sichergestellt werden kann. In den vorliegenden Untersuchungen konnte dies im Rahmen der methodischen Fehlerstreuung realisiert werden.

Material	Rauhigkeit	Fit-Modell [cm <sup>-1</sup> ]	Integration	Residuum	Total <sub>AmidI/II</sub>
Titan	niedrig	1525	11,84	0,0063039	24,72
		1595	7,88		
		1647	5,00		
	mittel	1518	23,23	0,00507866	44,42
		1590	14,01		
		1645	7,18		
	hoch	1523	33,67	0,0174088	62,96
		1594	17,42		
		1646	11,87		
Gold	niedrig	1447	15,05	0,00218636	29,01
		1579	9,59		
		1645	4,37		
	mittel	1455	23,72	0,00134925	35,83
		1596	8,94		
		1647	3,17		
	hoch	1463	25,12	0,00365182	37,31
		1583	8,79		
		1641	3,40		

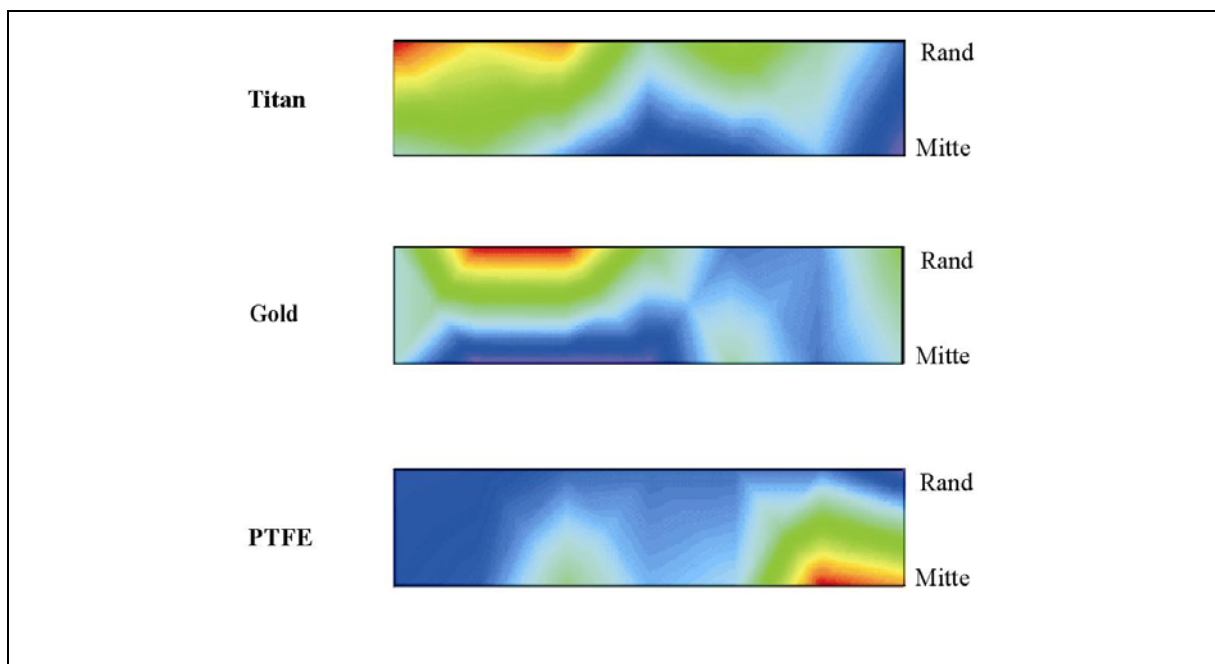
**Tab. 12:** Quantitative FTIR-Analyse akkumulierter Plaquebakterien auf den Oberflächen von Titan und Gold nach 89 h Inkubation (n=1)

### 3.2.5. LIF-Detektion

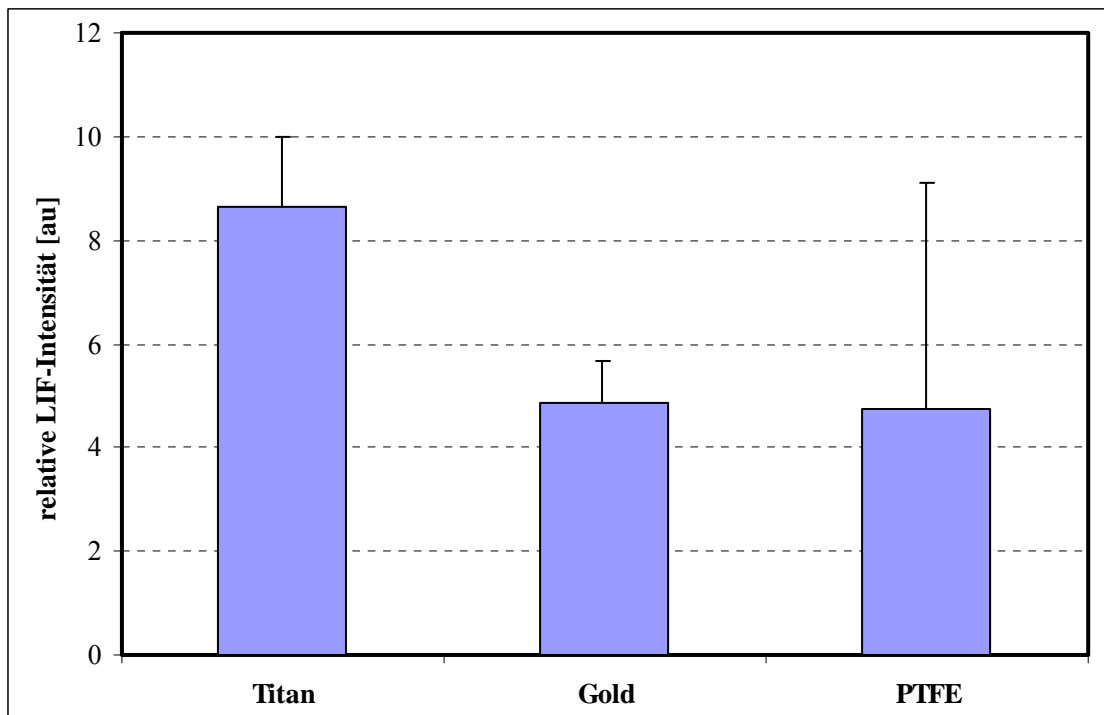
Im Rahmen der Entwicklung eines geeigneten Testdesigns wurde die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion für die direkte Analyse des Verteilungsmusters der adhärenierten Bakterien auf je einer exemplarischen Materialoberfläche eingesetzt. Sie beruht in der angewandten Gerätekonfiguration auf der sensitiven Bestimmung fluoreszierender Substanzen direkt auf der Probenoberfläche mittels einer lichtleitfasergekoppelten Fluoreszenzsonde (Durchmesser 4 mm) zur Anregung und Detektion der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Aufgrund der relativ großen Anregungsfläche auf der Probenoberfläche stellen die experimentellen Daten integrale Werte zur Beurteilung des Verteilungsmusters dar und ergänzen somit die mikroskopische REM-Analyse auf makroskopischer Ebene.

Aus der semiquantitativen Darstellung der detektierten Fluoreszenzintensitäten (Abb. 20) ist zu erkennen, dass auch die großflächige Verteilung der Bakterien auf den Oberflächen nicht homogen ist. Die in der Grafik dargestellten Farben sind normiert auf den Gesamtbereich  $\Delta I$  der jeweils auf der Materialoberfläche detektierten Fluoreszenzintensität und stellen nicht die absolut gemessene Fluoreszenzintensität dar. Blau-violette Bereiche markieren Areale mit der jeweils geringsten Fluoreszenzintensität, orange Bereiche die mit der höchsten Fluoreszenzintensität. Es zeigt sich, dass bei Titan und Gold die höchste Dichte an Bakterien jeweils am Rand des Fließkanals zu verzeichnen ist. Bei PTFE weisen weite Bereiche nur eine sehr geringe Bakterienbesiedlung auf. Jedoch treten auf PTFE gleichfalls distinkte Areale mit relativ starken Fluoreszenzsignalen auf. Auch die REM-Analyse bestätigte, dass auf PTFE eine relativ lokal begrenzte Plaqueakkumulation ausgehend von initialen Adhäsionsstellen auftritt, es an diesen Stellen jedoch zur Bildung großer Plaqueaggregate kommen kann. Eine wesentliche Schlußfolgerung aus der inhomogenen Verteilung der akkumulierten Plaqueschichten besteht in der Forderung einer integralen quantitativen Bestimmung der Zahl adhärierter Bakterien.

Das arithmetische Mittel der gemessenen Fluoreszenzintensitäten an den Messpunkten auf der Probenoberfläche kann für eine quantitative Bestimmung der Plaqueakkumulation genutzt werden (Abb. 21). Danach war die Plaqueakkumulation auf Titan höher, als bei Gold und PTFE. Die Fehlerstreuung zeigt, dass insbesondere auf PTFE höhere Varianzen auftreten, was indirekt auf eine inhomogenere Verteilung adhärierter Bakterien hindeutet.



**Abb. 20:** Verteilung akkumulierter Bakterien auf Titan, Gold und PTFE (LIF, DAPI-Markierung, blau: Areale mit geringer Fluoreszenzintensität, rot: Areale mit maximaler Fluoreszenzintensität)



**Abb. 21:** Fluoreszenzintensität adhärierter Bakterien nach 89 h Inkubation (n=14)

### 3.2.6. Quantitative Bestimmung der Bakterienzahl

Für die Analyse der Gesamtbakterienzahl wurde die direkte Zählung der von den Probenoberflächen abgelösten Bakterien am Fluoreszenzmikroskop angewandt. Dieses Verfahren verlangt zwar einige Erfahrung bei der Zählung bakterieller Zellen in einem Hämocytometer, bietet jedoch den Vorteil, ohne Zwischenkultivierung auf klassischen Agarnährböden die Bakterienzahl sofort nach Ablösung von der Materialoberfläche bestimmen zu können. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde DAPI verwendet, das eine kontrastreiche blaue Fluoreszenz der Bakterien bewirkt.

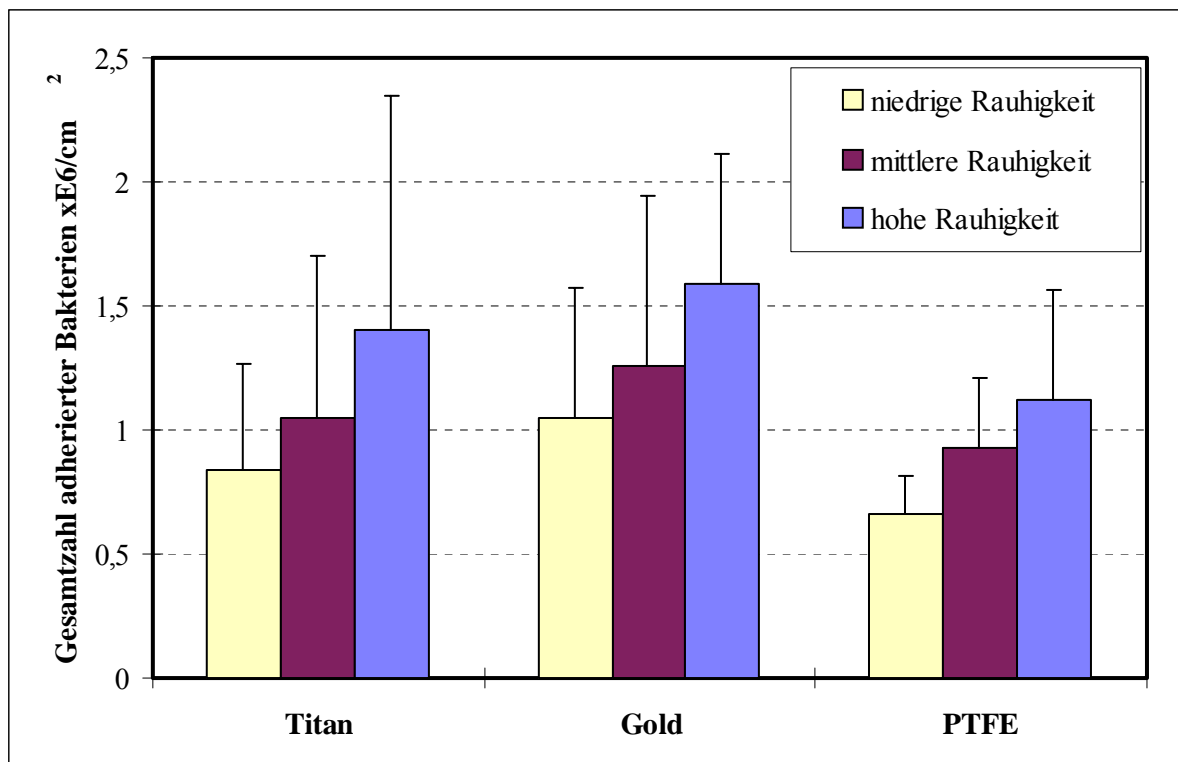
Die Analyse der Gesamtbakterienzahl zeigt eine Abhängigkeit der Plaqueadhärenz von der Oberflächenrauigkeit (Tab. 13, Abb. 22). Danach steigt die Plaqueakkumulation mit zunehmender Oberflächenrauigkeit. Der Einfluss der Oberflächentopografie ist signifikant für die PTFE-Oberflächenmodifikationen.

Die Ergebnisse bestätigen ebenfalls den Einfluss der Oberflächenenergie auf die Plaqueadhärenz. PTFE zeigt eine tendentiell niedrigere Plaqueakkumulation als die hochenergetischen Materialien Titan und Gold. Der oberflächenenergetische Einfluss auf die Plaqueadhärenz ist signifikant für die Oberflächen mit niedriger Rauigkeit. Hier ist der dominierende Einfluss der Oberflächentopografie auf die Plaquebildung minimiert und die oberflächenenergetisch bedingten Einflüsse können demonstriert werden. Hinsichtlich des klinischen Einsatzes polierter Materialien für die Zahnrestauration gewinnt dieser Befund besondere Bedeutung bei der Wahl geeigneter Zahnersatzmaterialien mit Oberflächenenergien, die zur Verringerung der Plaqueadhärenz beitragen.



Material	Rauhigkeit		
	niedrig	mittel	hoch
Titan	0,84 ± 0,42	1,05 ± 0,65	1,40 ± 0,94
Gold	1,05 ± 0,52	1,26 ± 0,69	1,59 ± 0,52
PTFE	0,66 ± 0,15	0,93 ± 0,28	1,12 ± 0,44

**Tab. 13:** Zahl adhärierter Bakterien auf Titan, Gold und PTFE nach 89 h Inkubation (Angaben  $\times 10^6/\text{cm}^2$ , n=40)

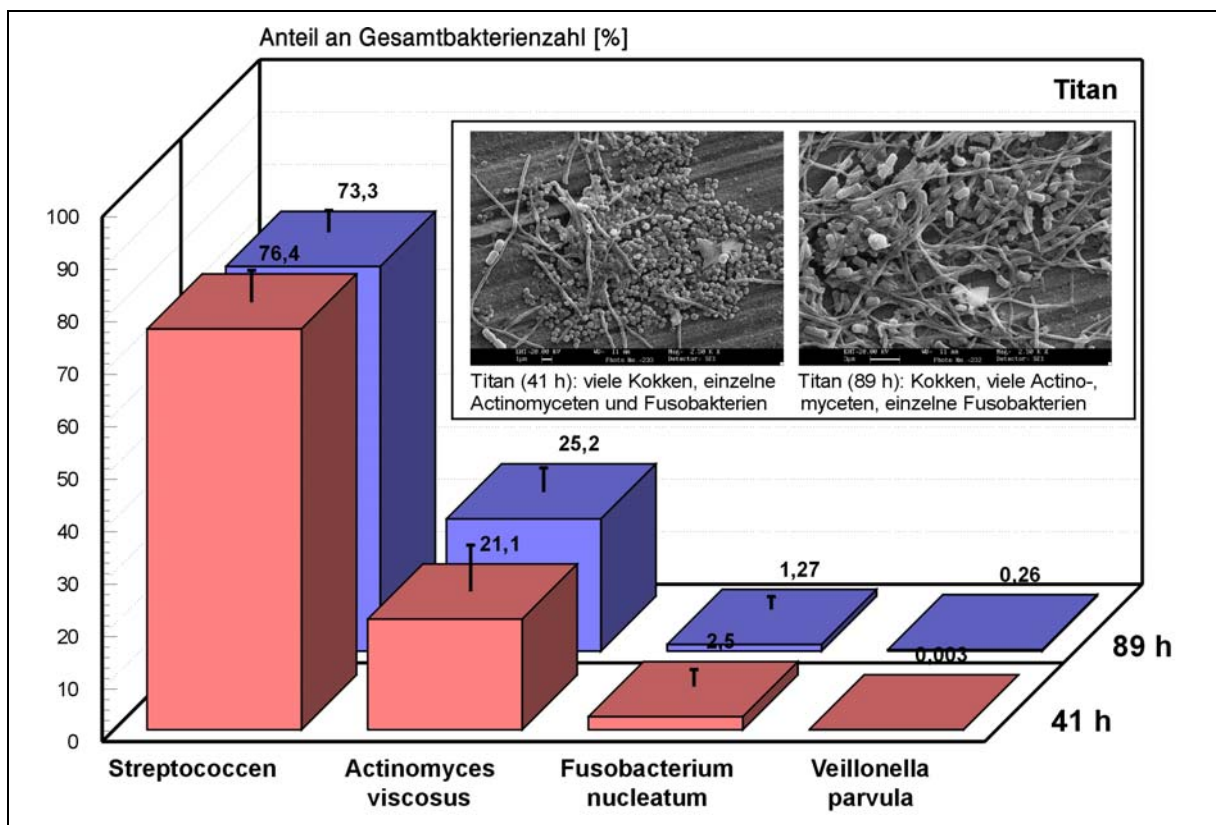


**Abb. 22:** Plaqueakkumulation in Abhängigkeit der Rauhigkeit und der Oberflächenenergie auf Titan, Gold und PTFE nach 89 h Inkubation (Fluoreszenzmarkierung abgelöster Bakterien mit DAPI und Zählung am Fluoreszenzmikroskop, n=15)

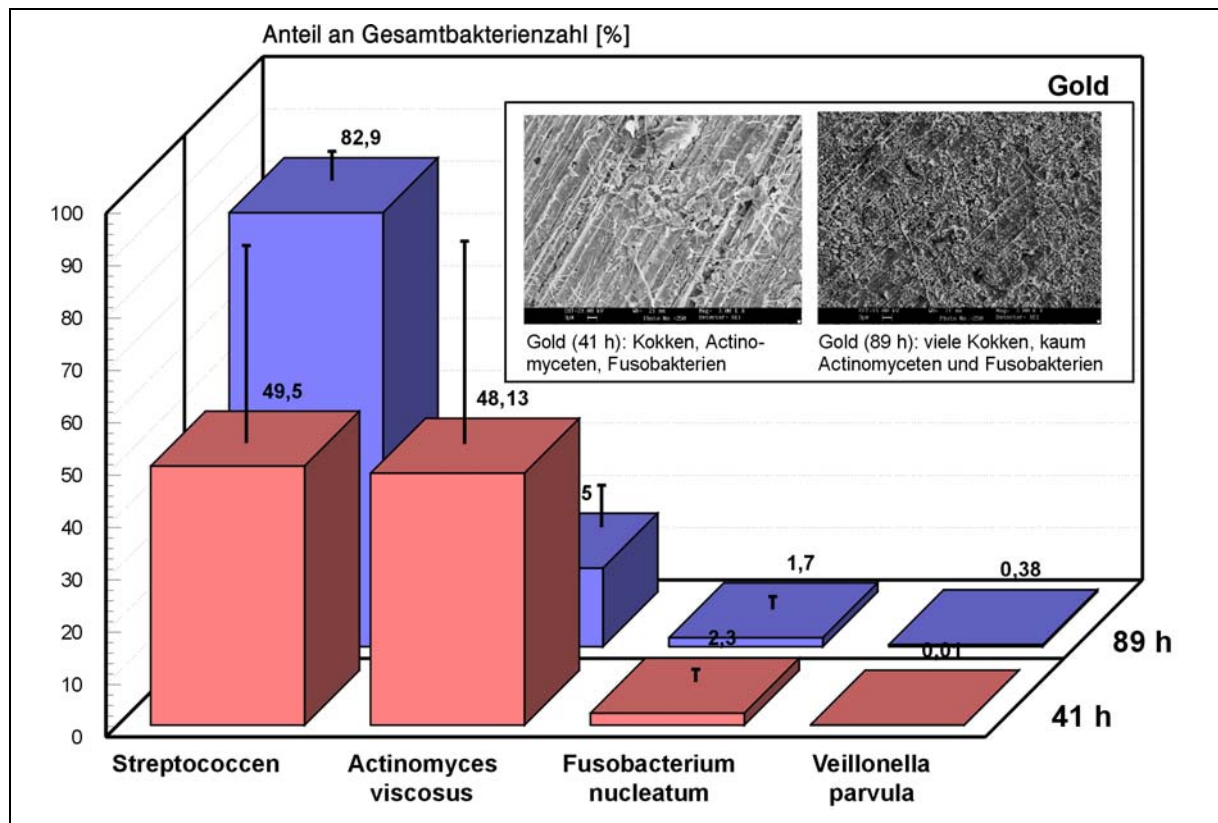
Aus methodischer Sicht bietet die direkte Bestimmung der Zahl abgelöster Bakterien mittels Fluoreszenzmikroskopie deutliche Vorteile im Vergleich zur konventionellen Agar-Kultivierungstechnik. Bei der Quantifizierung relativ geringer Bakterienzahlen ist jedoch immer ein methodischer Fehler gegeben, der als Ursache für die teilweise immer noch relativ hohen Standardabweichungen der Daten anzusehen ist.

Für die Analyse der speziesspezifischen Zusammensetzung der Plaque (Populationsdynamik, Abb. 23-25) während der Inkubation wurden Proben (hohe Rauhigkeit) nach 41 bzw. 89 h Inkubation entnommen und gemäß Kapitel 2.6.5. aufgearbeitet. Die Ergebnisse zeigen, daß hauptsächlich Streptokokken und Actinomyceten zur Bildung der Plaqueschicht beitragen. Besonders *Veillonella parvula* als sukzessiver Mikroorganismus der Plaque tritt erst nach längerer Inkubationszeit in der

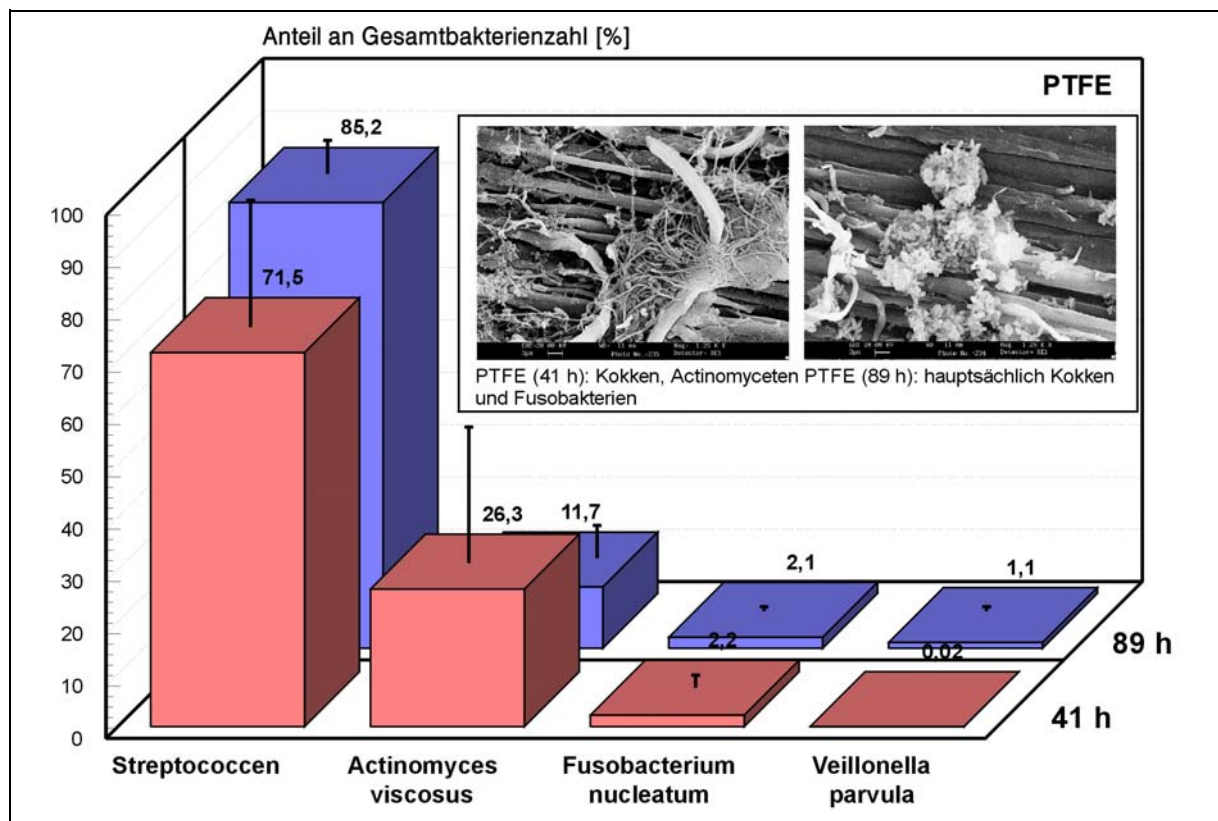
Plaque auf, was der in vivo-Situation in Plaqueschichten entspricht. Bei Titan ist im Laufe der Inkubation ein gleichbleibender Streptokokkenanteil, sowie ein leicht zunehmender Anteil an Actinomyceten zu verzeichnen. Bei Gold und PTFE nimmt dagegen der Anteil an Streptokokken zu, sowie der der Actinomyceten ab. Signifikante Unterschiede zwischen den Materialien hinsichtlich der Populationsdynamik bestehen nicht. Die Ergebnisse zum Titan im Vergleich zu Gold und PTFE weisen auf oberflächenchemische Faktoren aufgrund der stabilen Oxidschicht und ihrem Einfluß auf die Adhäsion von Plaquebakterien hin. Für eine systematische Analyse der Populationsdynamik, die für die vorliegenden Arbeiten nicht im Vordergrund stand, sind jedoch intensivere Untersuchungen z.B. mittels molekularbiologischer bzw. geeigneter FISH-Techniken erforderlich. Die Bestimmung anhand der selektiven Agarkultivierung weist dabei nur eine eingeschränkte Nachweisempfindlichkeit auf und ist daher nur als Verfahren mit orientierender Aussagekraft zu verstehen.



**Abb. 23:** Populationsdynamik in Plaqueschichten auf Titan (hohe Rauigkeit, Bestimmung der Bakterienspezies mittels Selektivagarnährböden, n=8)



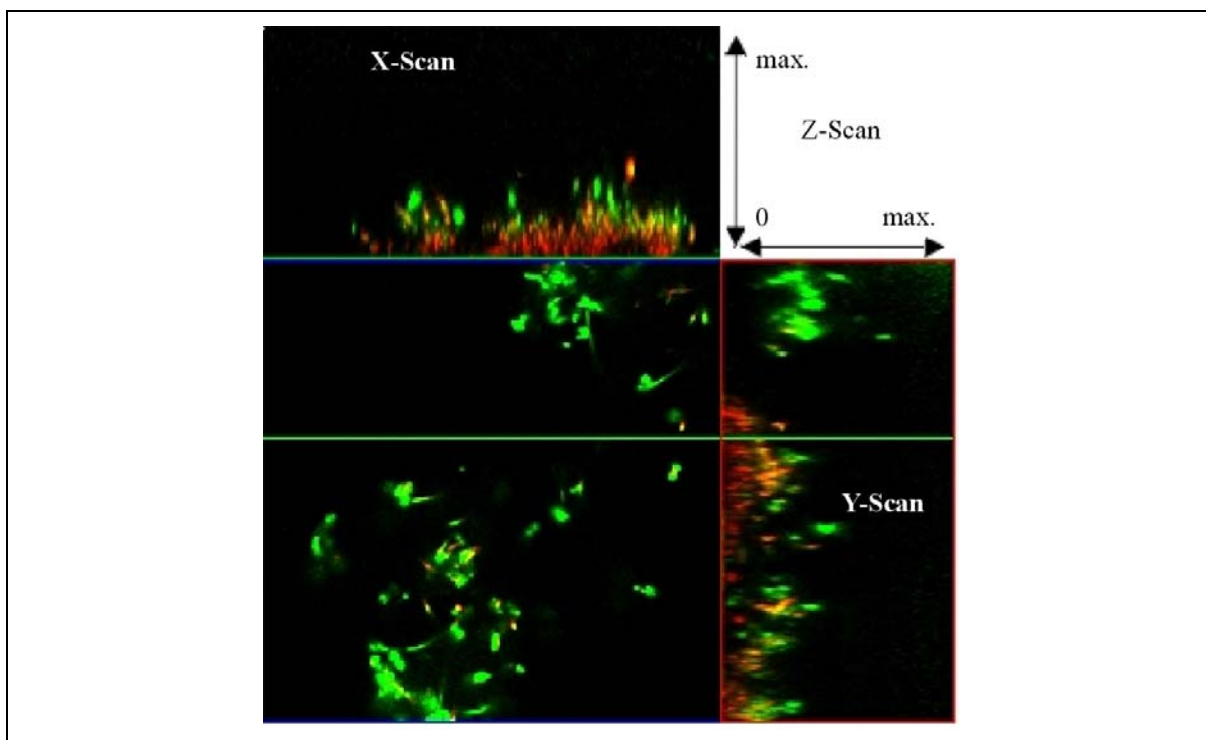
**Abb. 24:** Populationsdynamik in Plaqueschichten auf Gold (hohe Rauigkeit, Bestimmung der Bakterienspezies mittels Selektivagarnährböden, n=8)



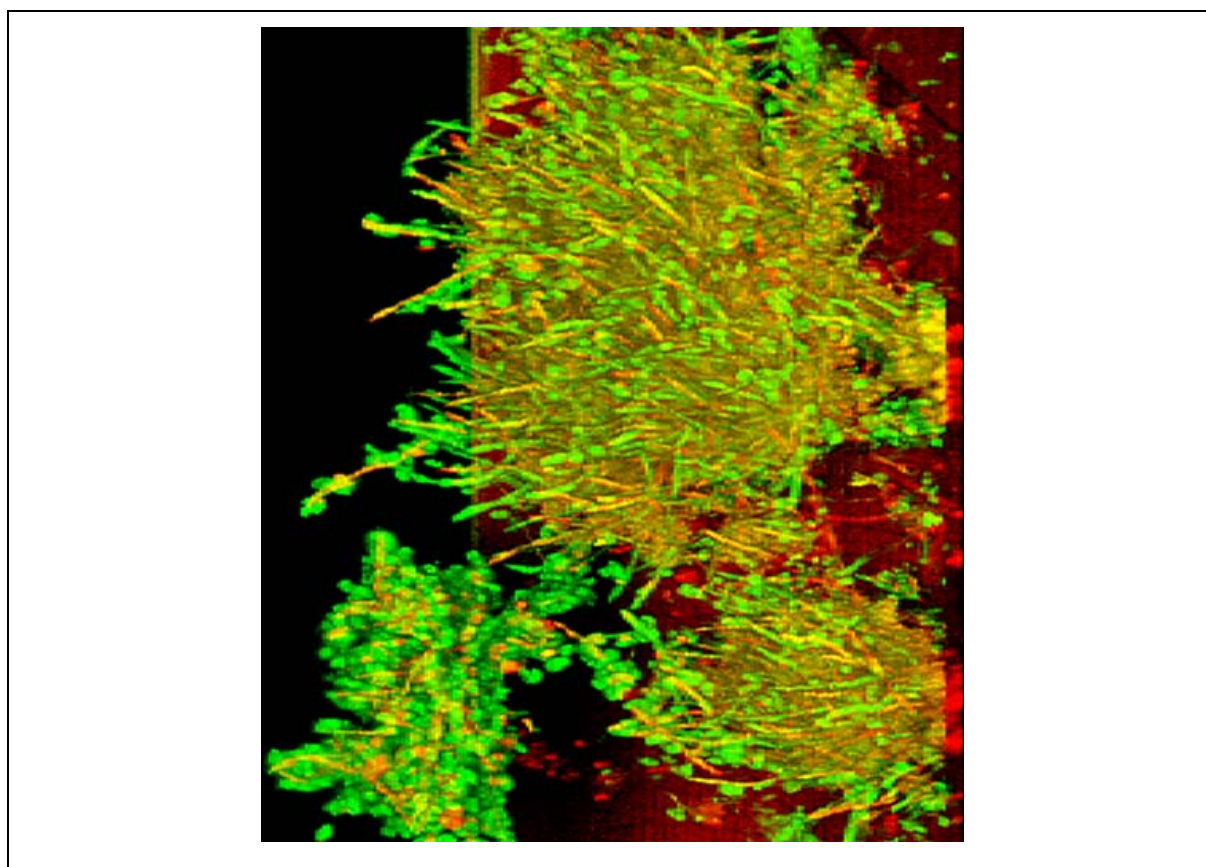
**Abb. 25:** Populationsdynamik in Plaqueschichten auf PTFE (hohe Rauigkeit, Bestimmung der Bakterienspezies mittels Selektivagarnährböden, n=8)

### 3.2.7. CLSM

Strukturelle Analysen an Plaqueschichten sind nur an intakten Filmen direkt auf der Materialoberfläche möglich. Die bei der REM-Analyse notwendige Trocknung führt zur Artefaktbildung und erlaubt keine Tiefenanalyse innerhalb der Plaque. Die CLSM-Technik ist als scannende Methode in Z-Richtung geeignet, native Plaqueschichten bis zu einer Dicke von ca. 100 µm zu analysieren. Die in den einzelnen Z-Schnitten aufgenommenen mikroskopischen Bilder können rechnergestützt in eine 3D-Rekonstruktion der Struktur kontrastgebender Plaquekomponenten transformiert werden. Für in vitro-generierte Plaqueschichten auf Titan (89 h Inkubation) wurde die räumliche Anordnung der Bakterien innerhalb der Schicht analysiert. Mit Hilfe der selektiven Fluoreszenzmarkierung lebender und toter Bakterien in den Plaqueschichten durch LIVE/DEAD® BacLight™ ist es möglich, neben strukturellen Daten auch Rückschlüsse auf die Aktivität des Biofilmes zu erhalten. In Abb. 26 ist ein in Z-Richtung aufgenommener Schnitt durch eine Bakterienaggregation auf der Materialoberfläche gezeigt. Die grüne Fluoreszenz zeigt lebende, die rote Fluoreszenz tote Bakterien an. Deutlich zu erkennen ist, dass tote Bakterien auf das Innere der Bakterienaggregation sowie direkt auf der Oberfläche konzentriert sind. Ähnliche Aussagen wurden in der Literatur über in vivo-Plaqueschichten getroffen [25, 138]. Die Ursache ist in der eingeschränkten Diffusion benötigter Nährstoffe zu suchen. Auch dieser Befund belegt die klinisch relevante Plaquesimulation mit Hilfe des vorliegenden in vitro-Testverfahrens. In Abb. 27 ist eine 3D-Rekonstruktion der nativen räumlichen Struktur der Bakterienaggregation gegeben. Man erkennt, dass die Bakterien nicht wie erwartet übereinandergeschichtet, sondern in bestimmten räumlichen Mustern (Cluster) in der (nichtmarkierten) Plaquematrix eingebunden sind. Lücken in der Struktur deuten auf die Ausbildung von Versorgungskanälen in den unteren Schichten der Plaqueaggregate hin, die von Wood et al. [66] und Hope et al. [138] beschrieben wurden. Diese sind jedoch nicht sehr deutlich ausgebildet, was in dem relativ jungen Alter der Plaqueschichten begründet sein kann. Ebenfalls sind „corncob“-ähnliche Coaggregationen zwischen den langen Fusobakterien und Kokken zu erkennen.



**Abb. 26:** Bakterienaggregation in einer Plaqueschicht auf Titan nach 89 h Inkubation mit Darstellung des Z-Schnittes in X- und Y-Richtung (CLSM). Tote Bakterien (rote Fluoreszenz) befinden sich innerhalb der Aggregation. Die äusseren Bereiche stellen lebende Bakterien (grüne Fluoreszenz) dar. Die mittlere Darstellung stellt die Momentanansicht eines Z-Schnittes im oberen Drittel der Plaqueschicht dar.



**Abb. 27:** 3D-Rekonstruktion der Plaquestruktur (Darstellung in einem Winkel von ca. 45°)

### 3.2.8. Zusammenfassung

Die Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächentopografie und Oberflächenenergie auf die Plaqueadhärenz zeigen, dass:

- das entwickelte Messsystem zur in vitro-Plaquesimulation geeignete Voraussetzungen schafft, bakterielle Mischkulturen dentaler Bakterienstämme in einem Fließkammersystem über mehrere Tage unter reproduzierbaren dynamischen Bedingungen auf Dentalmaterialien zu applizieren,
- die in vitro generierten Plaqueschichten in wesentlichen Eigenschaften (Bakteriendichte, EPS-Produktion, Populationszusammensetzung) den natürlichen Plaquebiofilmen der Mundhöhle entsprechen,
- die Plaqueadhärenz wesentlich von der Materialoberflächentopografie bestimmt wird,
- bei niedrigen Rauhtiefen (polierten Oberflächen) der Einfluss der Materialoberflächenenergie auf die Plaqueadhärenz steigt.

### 3.3. In vitro-Untersuchungen an praxisrelevanten Dentalmaterialien

Die aus materialwissenschaftlicher Sicht durchgeführten systematischen Untersuchungen zum Einfluss der Materialtopografie und -energie auf die Plaqueakkumulation wurden im Hinblick auf den Einsatz des Prüfsystems als screenende in vitro-Prüfmethodik für die Plaqueprüfung an dentalen Werkstoffen der Praxis durch Ergebnisse einer praxisorientierten Materialprüfung ergänzt. Hierfür wurde das in vitro-Testdesign den Erfordernissen einer praxisnahen in vivo-Probandentestung angepasst. In Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Mund- und Kieferheilkunde (ZMK) der Georg-August-Universität Göttingen wurde in Voruntersuchungen eine optimale Versuchsdauer von 15 h ermittelt. Diese Inkubationsspanne erlaubt die in vitro-Prüfung in der frühen Entwicklungsphase der Plaque und entspricht u.a. auch praxisnahen Tragebedingungen bei Probandentestungen. Die für die vergleichenden Untersuchungen ausgewählten Materialien repräsentieren jeweils Dentalwerkstoffe mit hoher klinischer Bedeutung und werden vom ZMK Göttingen verstärkt für Dentalrestaurationen eingesetzt. Im Gegensatz zu den systematischen Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenenergie und -topografie auf die Plaqueadhärenz u.a. mit definiert eingestellten Oberflächenrauheiten wurden die Untersuchungen an Dentalmaterialien unter den Bedingungen der zahnärztlichen Praxis und den damit verbundenen Politurtechniken durchgeführt.

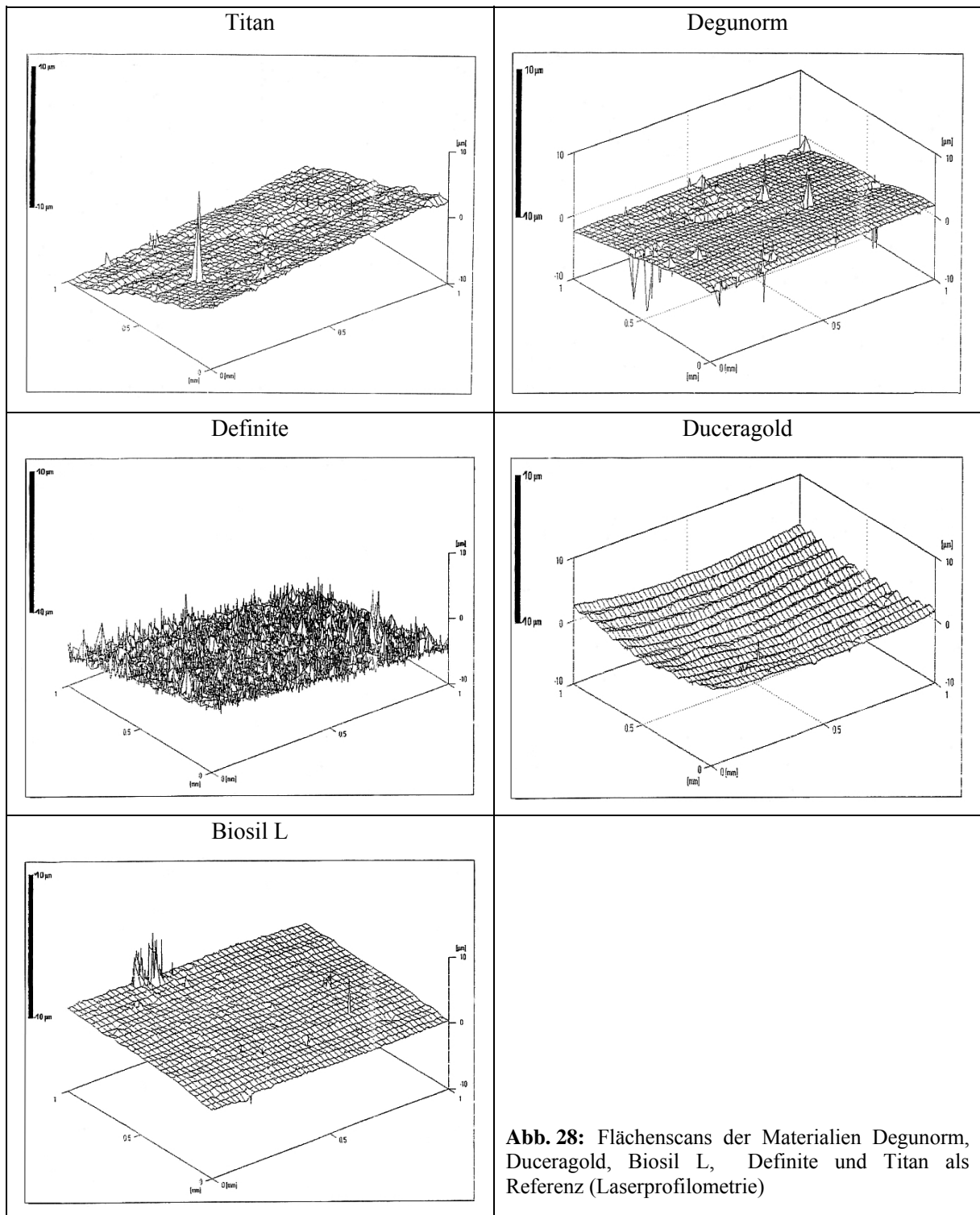
### 3.3.1. Materialoberflächentopografie

Die durch verschiedene Politurverfahren (siehe Tab. 4) vorbereiteten Oberflächen weisen typische Merkmale polierter Oberflächen auf. Insbesondere die Oberflächen von Titan, Degunorm und Duceragold sind im Submikrometerbereich sehr wenig strukturiert (Abb. 28 und 29). Allerdings treten auf Degunorm stellenweise Fehlstellen aufgrund der Präparation der relativ weichen Goldlegierung auf. Der Kompositwerkstoff Definite zeigt teilweise eine strukturierte Oberfläche. Hier treten die höchsten  $R_a$ -Werte auf, was auf die Probenpräparation zurückzuführen ist (Tab. 14). Auch Carlen et al. [162] beschreibt für einen Kompositwerkstoff auf Polyacrylsäure-Basis eine höhere Rauigkeit nach Politur im Vergleich zu metallischen und keramischen Werkstoffen. Eine Sonderstellung nimmt Biosil L ein. Die größtenteils sehr glatte polierte Oberfläche wird stellenweise von Lunkern unterbrochen, die auf Gussfehler bei der Herstellung zurückzuführen sind (Abb. 29). Alle Materialien (ausser Definite mit gewissen Einschränkungen) zeigen damit eine niedrige Rauigkeit, wobei bei der Bewertung der Plaqueadhärenz insbesondere auf Biosil L und Definite der Einfluss der Oberflächenfehlstellen berücksichtigt werden muss.

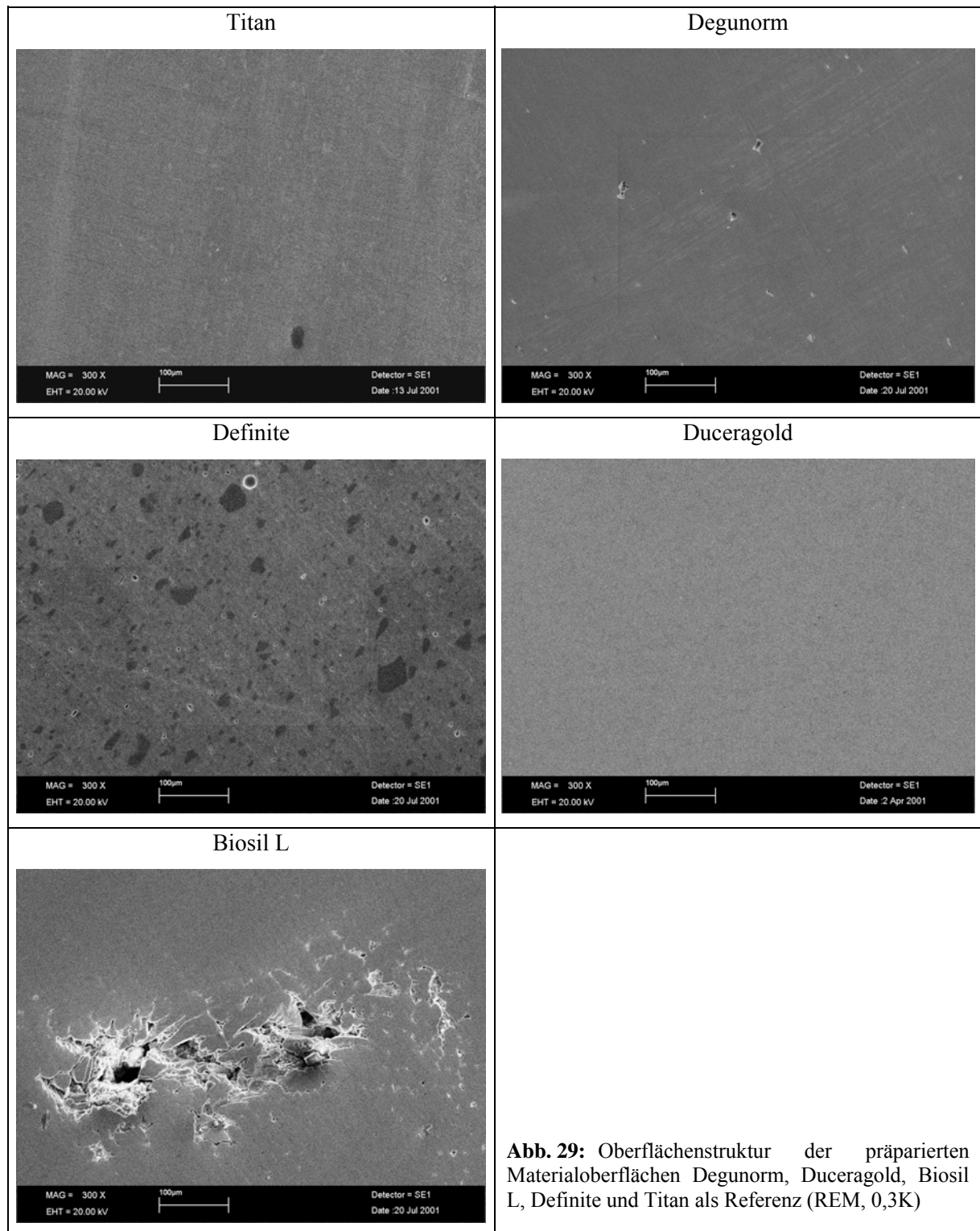
Material	$R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_{\text{max}}$ [ $\mu\text{m}$ ]
Titan	0,10	1,93
Degunorm	0,04	0,38
Definite	0,56	5,57
Duceragold	0,09	3,28
Biosil L	0,09	1,73

**Tab. 14:** Rauigkeit von Degunorm, Biosil L, Definite und Duceragold für Untersuchungen der Bakterienadhäsion auf Materialien der dentalen Praxis (Titan als Referenz)









### 3.3.2. Materialoberflächenenergie

Hinsichtlich der oberflächenenergetischen Eigenschaften sind die Testmaterialien mit Ausnahme von Biosil L hochenergetische Werkstoffe (Tab. 15 und 16, Abb. 30). Eine Sonderstellung nimmt die Co-Cr-Legierung Biosil L ein. Die reine, unmodifizierte Oberfläche (ohne Albumin-Adsorption) weist

entgegen den metallischen Werkstoffen Titan und Degunorm eine verminderte Oberflächenspannung sowie eine deutlich niedrigere Polarität auf.

Auch hier ist der nivellierende Effekt adsorbierenden Albumins nachweisbar. Auf allen Materialien ausser Biosil L verringert sich die Oberflächenspannung. Auf Biosil L hat das adsorbierende Albumin keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung (Tab. 17). Der polare Anteil der Oberflächenspannung wird durch die Proteinadsorption bei allen Materialien verschoben (Tab. 18, Abb. 31). Gegenüber Titan, das eine moderate Erhöhung der Polarität aufweist, verringert sich diese bei allen anderen Materialien ausser Biosil L. Auf Biosil L tritt eine Erhöhung auf, wohingegen Degunorm eine deutliche Verringerung der Polarität zeigt. Insofern folgen die Ergebnisse für die hochgoldhaltige Legierung Degunorm exakt dem beschriebenen Trend von Gold (siehe Punkt 3.2.2.). Zur Fehlerbetrachtung gelten die unter 3.2.2. ausgeführten Anmerkungen.

Material	A.dest.	Ethylenglycol	Dijodmethan	Formamid
Titan	50,1 ± 3,0	35,3 ± 2,6	43,5 ± 3,5	37,3 ± 2,2
Degunorm	49,8 ± 2,6	42,2 ± 3,6	38,4 ± 2,1	41,8 ± 2,3
Definite	74,3 ± 4,1	49,4 ± 3,2	45,8 ± 3,6	57,4 ± 4,2
Ducragold	50,2 ± 2,9	48,4 ± 2,3	44,0 ± 1,5	47,1 ± 1,6
Biosil L	92,1 ± 3,4	71,9 ± 1,3	50,6 ± 1,6	72,7 ± 2,3

**Tab. 15:** Kontaktwinkel der Testflüssigkeiten auf Degunorm, Biosil L, Definite und Ducragold (Titan als Referenz) [°]

Material	Oberflächen- spannung [mN/m]	dispersiv [mN/m]	polar [mN/m]	Polarität [%]
Titan	49,3	34,1	15,2	30,8
Degunorm	48,7	35,2	13,4	27,5
Definite	40,7	35,7	4,9	12,0
Ducragold	45,7	30,6	15,1	33,0
Biosil L	34,1	33,4	0,7	2,1

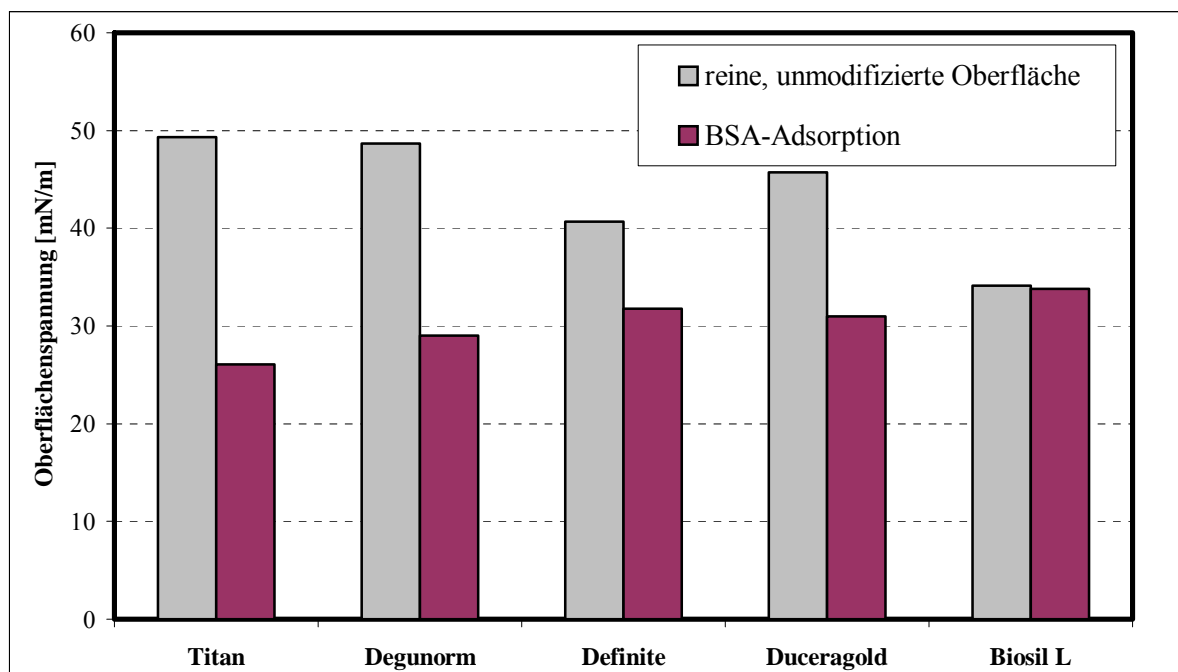
**Tab. 16:** Kalkulation der oberflächenenergetischen Parameter von Degunorm, Biosil L, Definite und Ducragold auf der Basis der Kontaktwinkel (Titan als Referenz)

Material	A.dest.	Ethylenglycol	Dijodmethan	Formamid
Titan	$88,9 \pm 2,1$	$50,4 \pm 3,9$	$46,9 \pm 1,9$	$89,3 \pm 0,8$
Degunorm	$93,8 \pm 1,7$	$55,3 \pm 4,5$	$59,4 \pm 1,2$	$80,7 \pm 5,0$
Definite	$80,8 \pm 4,1$	$52,7 \pm 3,7$	$50,8 \pm 4,9$	$80,1 \pm 3,3$
Ducragold	$91,1 \pm 4,9$	$47,6 \pm 5,7$	$51,0 \pm 4,2$	$80,0 \pm 3,8$
Biosil L	$77,7 \pm 4,8$	$53,3 \pm 0,8$	$41,7 \pm 2,0$	$78,8 \pm 1,1$

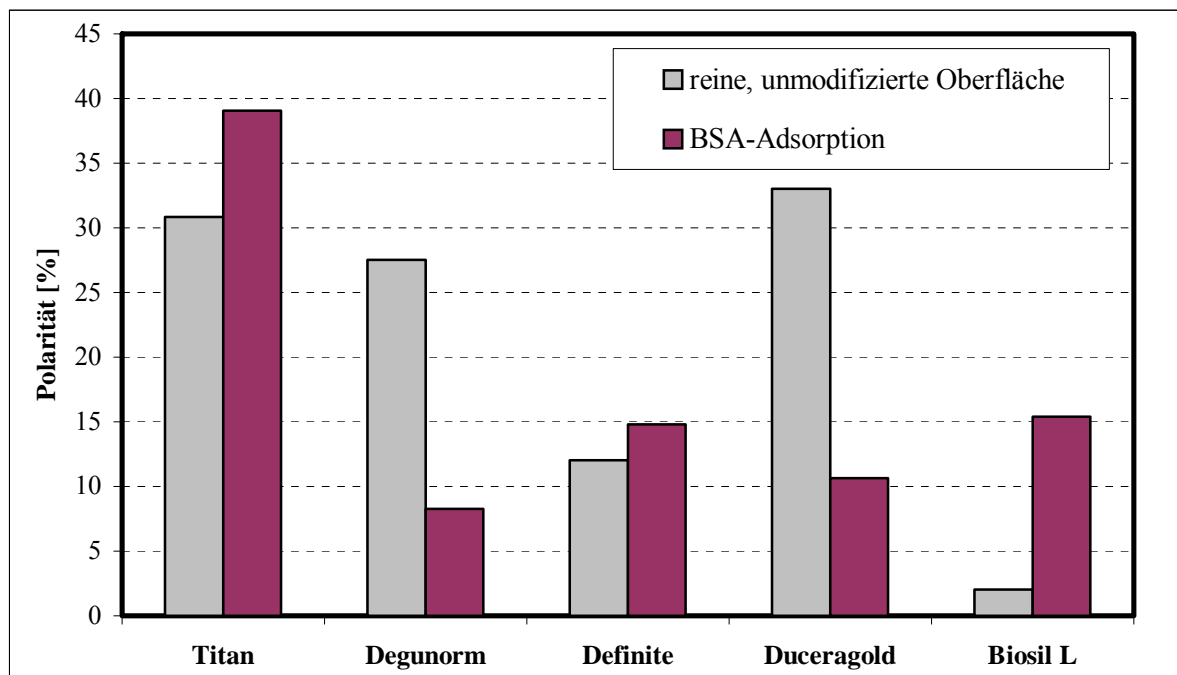
**Tab. 17:** Kontaktwinkel der Testflüssigkeiten auf Titan, Degunorm, Definite, Ducragold und Biosil L mit adsorbiertem Albumin [°]

Material	Oberflächen- spannung [mN/m]	dispersiv [mN/m]	polar [mN/m]	Polarität [%]
Titan	26,1	15,9	10,2	39,1
Degunorm	29,0	26,6	2,4	8,3
Definite	31,8	27,1	4,7	14,8
Ducragold	31,0	27,7	3,3	10,6
Biosil L	33,8	28,6	5,2	15,4

**Tab. 18:** Effekt der Albuminadsorption auf die Materialoberflächenenergie und Polarität



**Abb. 30:** Oberflächenspannung der reinen, unmodifizierten Materialoberflächen von Titan, Degunorm, Definite, Ducragold und Biosil L im Vergleich mit Albumin-adsorbierten Oberflächen



**Abb. 31:** Polarität der reinen, unmodifizierten Materialoberflächen von Titan, Degunorm, Definite, Duceragold und Biosil L im Vergleich mit Albumin-adsorbierten Oberflächen

### 3.3.3. REM

Obwohl alle Probekörper von Plaquebakterien besiedelt werden, sind in der Verteilung sowie in der Struktur der sich bildenden Plaqueschichten Unterschiede sichtbar. In Abb. 32 sind typische REM-Aufnahmen auf den jeweiligen Materialien gezeigt. Auf allen *in vitro*-Proben überwog der Anteil kokkaler Mikroorganismen. Der zahlenmäßig hohe Anteil von Streptokokken korreliert mit den Befunden zur Zusammensetzung einer frühen Plaqueschicht [16, 165]. Bei Titan, Degunorm und Definite treten auch lange Fusobakterien als Sekundärbesiedler auf. Dies wird auf die funktionellen metabolischen Wechselbeziehungen zwischen säurebildenden Bakterien (vor allem Streptokokken) und säureverwertenden Spezies (u.a. *Fusobacterium*, aber auch die sehr kleinen kokkenförmigen Veillonellen) zurückgeführt. Auf Titan ist tendentiell die meiste Plaquemenge, bestehend vorwiegend aus Kokken, den Erstbesiedlern einer dentalen Plaque, visuell zu erkennen. Eine relativ homogene geschlossene Plaqueschicht ist auf Degunorm und Duceragold vorhanden, wobei bei letzterem Material die Schicht großflächig aufreißen kann. Bei Definite weisen die Bakterien eine unregelmäßige, integral jedoch einheitliche Besiedelung auf. Auf Biosil sind in der Regel sehr wenige Bakterien zu finden. Nur punktuell treten größere Bakterienaggregationen auf, die wiederum mit den Fehlstellen der Oberfläche korrelieren. Dies ist auf die raue Oberflächentopografie an diesen Stellen zurückzuführen, die die Initialadhäsion von Bakterien fördert. Unabhängig von der Oberflächentopografie heften sich dann weitere Mikroorganismen an die Erstbesiedler an und fördern die Entstehung größerer Bakterienaggregationen. Die in Abbildung 32 sichtbaren flächig

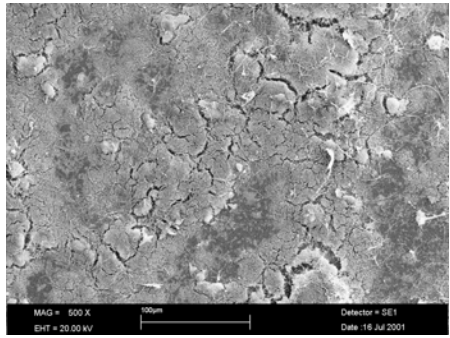
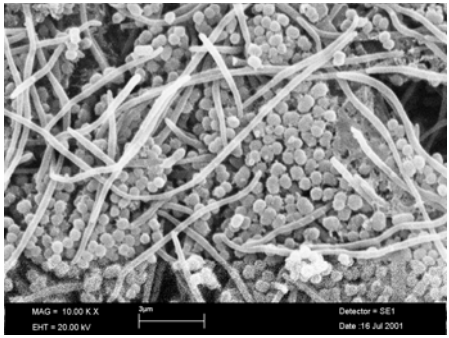
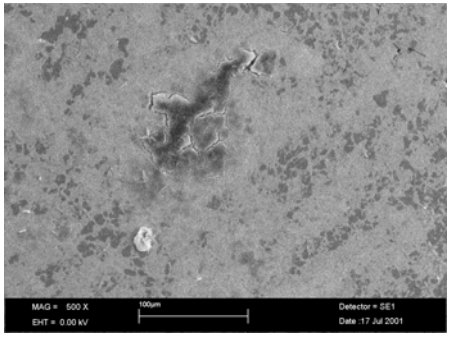
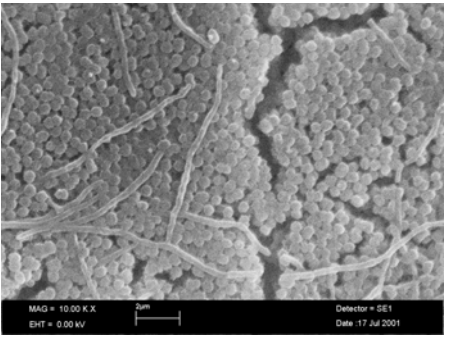
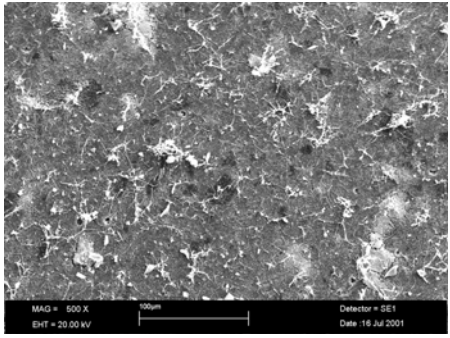
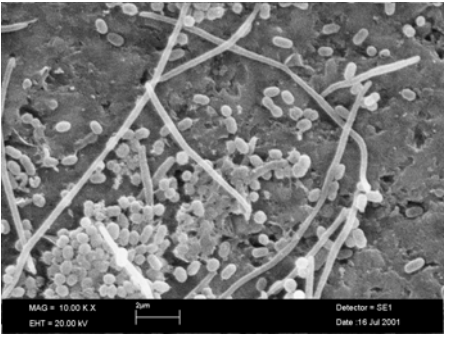
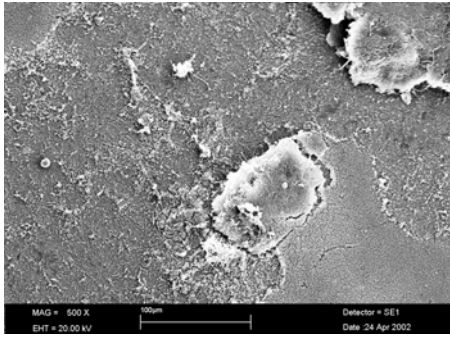
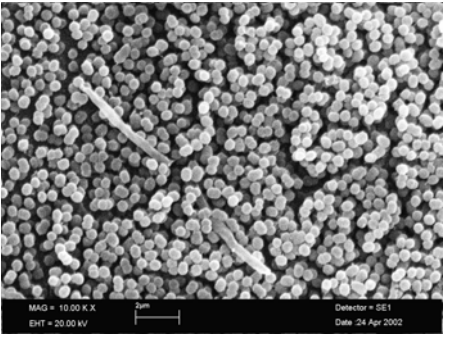
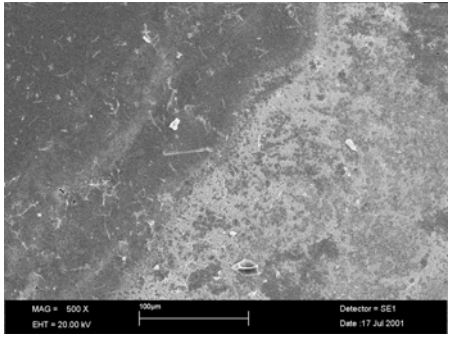
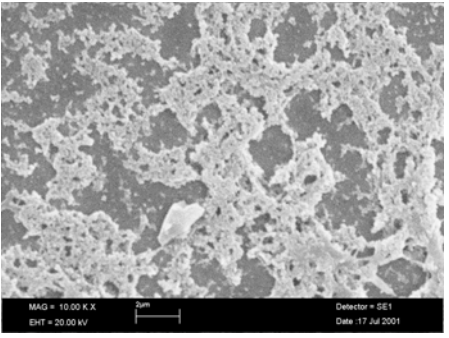
0,5K	10K	
		Titan
		Degunorm
		Definite
		Duceragold
		Biosil L

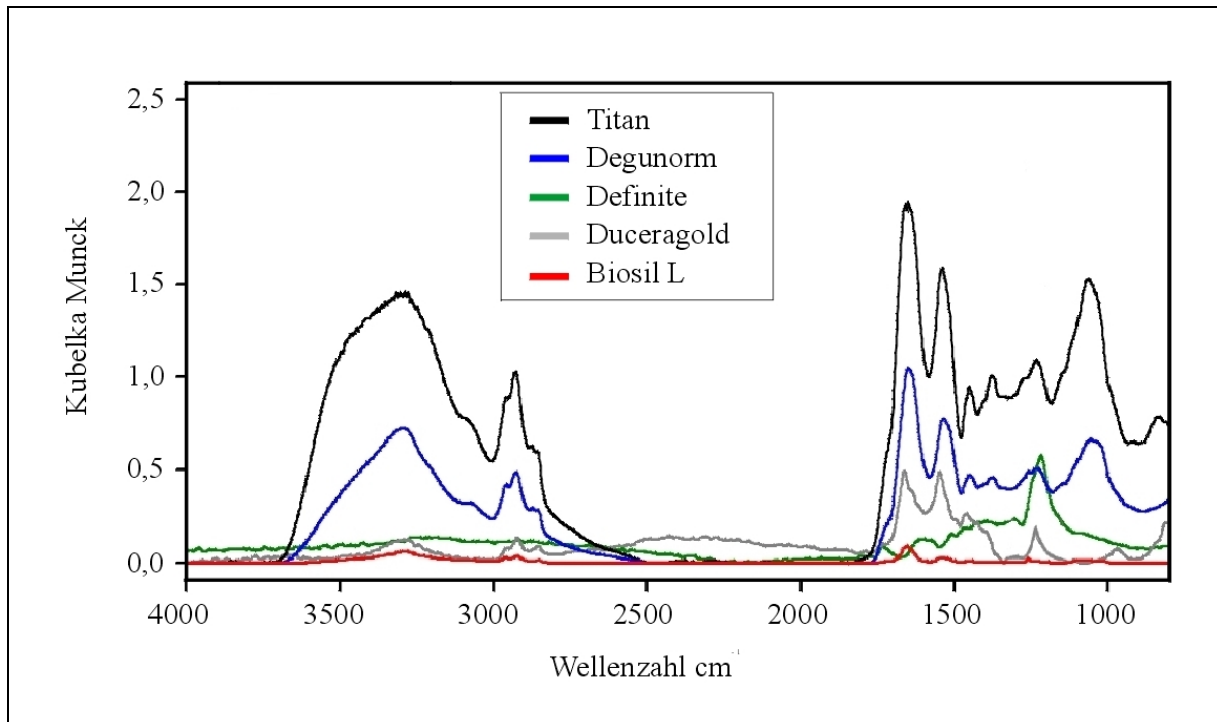
Abb. 32: Adhärerte Plaquebakterien nach 15 h Inkubation (REM)

ausgebreiteten Strukturen auf Biosil L weisen eine für die verwendeten Bakterienstämme zu geringe Ausdehnung auf (ca. 0,2  $\mu\text{m}$ ): Diese Strukturen sind auf der gesamten Oberfläche von Biosil L großflächig zu finden und stellen keine Bakterien dar. Sie sind eher auf Materialablagerungen bzw. Aufarbeitungsartefakte von auf der Oberfläche verbleibenden adsorbierten EPS-Bestandteilen zurückzuführen.

#### **3.3.4. FTIR-Mikroskopie**

Der FTIR-spektroskopische Nachweis der adhärierten Plaquemenge korreliert mit den REM-Befunden (Abb. 33). Die nachweisbaren Amidpeaks in den Spektren der Materialoberflächen sind auf den bakterienassoziierten Proteinanteil zurückzuführen. Deutlich sind im Wellenzahlbereich 1700-1250  $\text{cm}^{-1}$  die spezifischen Amidbanden zu erkennen. Die Signalintensität als Maß der Menge adhärierter Plaquebakterien bildet die Grundlage für die Bewertung der Plaqueadhärenz. Demnach kann auch FTIR-spektroskopisch eindeutig die sehr geringe Plaqueadhärenz auf Biosil L gezeigt werden. Es sind nur andeutungsweise Amid-Peaks zu erkennen. Mit steigender Plaqueadhärenz sind die Peaks deutlicher ausgeprägt. Titan erreicht die höchsten Werte. Die deutlichen Peaks im Bereich 2850-3500  $\text{cm}^{-1}$  repräsentieren Kohlenstoffbindungen mit Sauerstoff und Wasserstoff sowie Hydroxylgruppen. Es handelt sich hier um typische Absorptionsschwingungen für Polysaccharide (auch EPS der Plaqueschichten) sowie Carbonsäuren. Diese Peaks sind ein weiterer Beleg für die Ausbildung zahnplaque-typischer Bakterien-schichten durch die angewendete in vitro-Plaquesimulation. Die Bildung von EPS korreliert dabei mit der Plaquemenge, was als Indiz für eine plaqueassoziierte Produktion von EPS-Substanzen auf allen untersuchten Materialien gewertet wird.

Aufgrund der gegenüber den metallischen Werkstoffen Titan, Degunorm und Biosil L unterschiedlichen Reflexionseigenschaften der Materialien Duceragold und Definite, die mit einer Verminderung der Bandenintensität verbunden ist, kann ein direkter Vergleich der Amid-Peakhöhe als halbquantitatives Maß für die Plaqueadhärenz für diese Materialien nur bedingt erfolgen. Die Kubelka-Munck-Transformation ermöglicht jedoch in bestimmten Grenzen eine quantitative Aussage zur Plaquebildung auf Materialien mit unterschiedlichen Reflexionseigenschaften, da in diesem Fall eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration (und damit der Menge an bakterienassoziiertem Protein pro Flächeneinheit) und der Reflektivität der Probe vorliegt [166]. Für das Material Definite konnten jedoch aufgrund der schlechteren Reflexionseigenschaften im Vergleich zu den weiteren Materialien keine entsprechenden Amid- und EPS-Peaks detektiert werden trotz der Akkumulation von Plaquebakterien auf der Oberfläche (vergleiche Abb. 32). Insofern ist die FTIR-Analyse streng genommen auf die vergleichende Analyse metallischer Materialproben beschränkt.



**Abb. 33:** Spektren plaquebesiedelter Probekörperoberflächen nach 15 h Inkubation (FTIR-Mikroskop)

### 3.3.5. Quantitative Bestimmung der Bakterienzahl

Im Gegensatz zu den quantitativen Tests der Plaqueadhärenz an den Modellmaterialien unter Anwendung der Fluoreszenzmarkierung abgelöster Bakterien mit DAPI (siehe Kapitel 3.2.6.) wurde für die Analyse auf den praxisrelevanten Materialien ein alternatives Verfahren für die Fluoreszenzmarkierung angewandt. Mit Hilfe des LIVE/DEAD® BacLight™-Kit kann zwischen lebenden und toten Bakterienanteilen in einer Bakterienpopulation unterschieden werden. Dadurch gewinnt die quantitative Bestimmung adhärierter Bakterien auf den Materialoberflächen eine wesentlich größere Aussagekraft, da die experimentell ermittelten Daten die Gesamtpopulation aus lebenden sowie toten Bakterien darstellen und der tatsächlich in Biofilmen vorliegenden Komplexität Rechnung tragen. Da in einer Plaqueschicht ein erheblicher Anteil an toten Bakterien auftreten kann, der ebenfalls zur Strukturierung der Plaque beiträgt [25], liefert diese Methodik ein reales Bild der Gesamtbesiedlung auf den Materialien. Voruntersuchungen konnten zeigen, dass die wichtige Voraussetzung der Anfärbbarkeit aller Bakterien der Bakterienpopulation erfüllt ist. Somit sind vergleichende Untersuchungen an den verschiedenen Materialien uneingeschränkt möglich. Aufgrund der methodisch bedingten relativ großen Fehlerbehaftung quantitativer Daten zur speziesspezifischen Zusammensetzung der adhärieren Bakterienpopulation wurden keine Tests zur Bestimmung über Selektivagarnährböden vorgenommen. Die REM-Untersuchungen (siehe Kapitel 3.3.3.) sowie eine routinemäßige halbquantitative Einschätzung der von den Materialien abgelösten Populationen zeigten jedoch keine gravierenden Abweichungen zur Populationszusammensetzung im Vergleich zu den

Untersuchungen an den Modellmaterialien (siehe 3.2.6.). Auch auf den Praxismaterialien dominierten Kokken (*S. mutans*, *S. sanguinis*) die initialen Plaquepopulationen.

In Tabelle 19 sowie Abbildung 34 sind die über alle analysierten Proben gemittelten Gesamtzahlen adhärierter Bakterien sowie der jeweilige Anteil lebender und toter Bakterien dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Plaqueadhärenz materialspezifische Unterschiede zeigt. Titan weist im Vergleich mit den weiteren Materialien die höchste Plaqueadhärenz auf. Die Materialien Degunorm und Definite zeigen vergleichbare und eine gegenüber Titan deutlich reduzierte Plaqueadhärenz. Auf Biosil L ist die mit Abstand geringste Plaqueadhärenz zu verzeichnen. Alle detektierten Unterschiede der Plaqueadhärenz in Abhängigkeit der Materialien sind signifikant (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,05$ ). Die quantitative Analyse bestätigt die REM- und FTIR-Analysen. Anhand der Ergebnisse kann ein eindeutiges Material-Ranking bezüglich der Plaqueadhärenz vorgenommen werden:

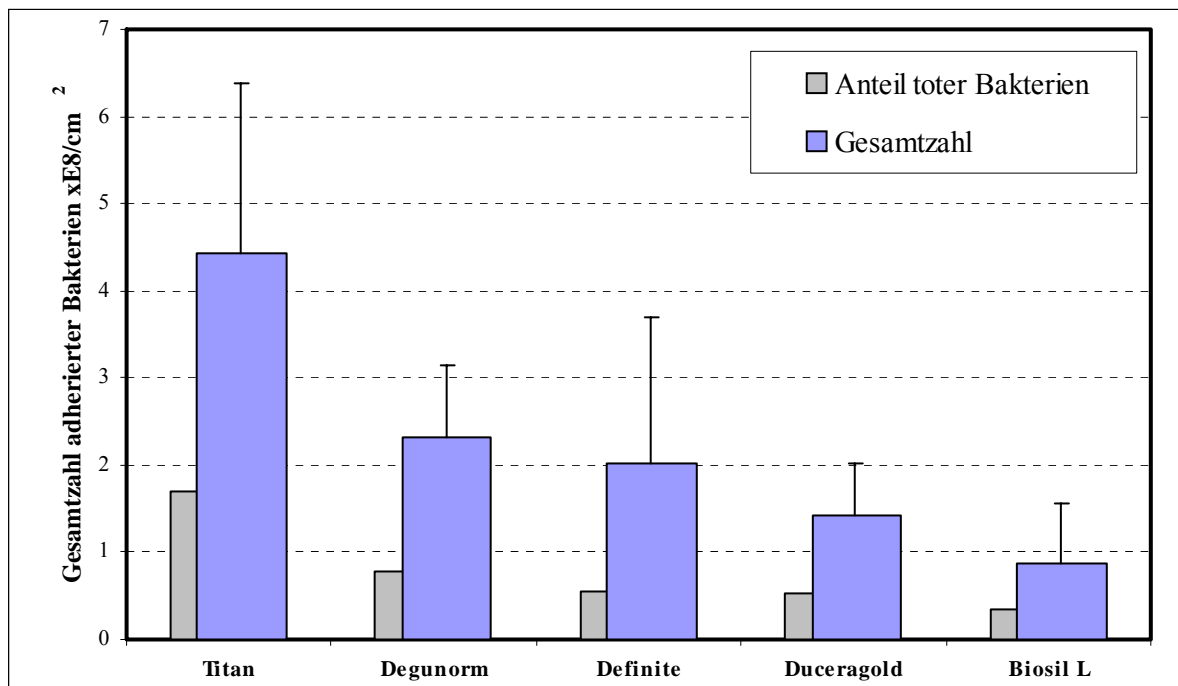
Titan > Degunorm > Definite > Duceragold > Biosil L

Die Untersuchungen zur Zusammensetzung der Plaque entsprechend dem Anteil lebender und toter Bakterien zeigen, dass das Lebend-/Tot-Verhältnis keine wesentlichen Unterschiede in Abhängigkeit von der Materialoberfläche aufweist (Tab. 19). Lediglich auf Definite wurde ein leicht erhöhter Anteil lebender Bakterien bestimmt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass a) die Materialoberflächen keine antibakteriellen Effekte zeigen und b) die Verringerung der Plaqueadhärenz insbesondere auf Biosil L auf spezifische Materialoberflächenparameter zurückzuführen ist.

	Gesamtzahl	Lebend	Tot	Lebend/Tot
Titan	$4,42 \pm 1,96$	2,73	1,69	1,6
Degunorm	$2,32 \pm 0,83$	1,54	0,77	2,0
Definite	$2,02 \pm 1,67$	1,48	0,54	2,7
Duceragold	$1,43 \pm 0,60$	0,89	0,54	1,7
Biosil L	$0,87 \pm 0,70$	0,53	0,34	1,6

**Tab. 19:** Gesamtzahl adhärierter Bakterien mit dem Anteil lebender und toter Bakterien (Mittelwert) auf den Testmaterialien nach 15 h Inkubation (Angaben  $\times 10^8/\text{cm}^2$ , Fluoreszenzmarkierung abgelöster Bakterien mit LIVE/DEAD® BacLight™ und Zählung am Fluoreszenzmikroskop,  $n_{\text{Titan/Definite}}=18$ ,  $n_{\text{Degunorm/Biosil L}}=26$ ,  $n_{\text{Duceragold}}=37$ )





**Abb. 34:** Gesamtzahl adhärierter Bakterien sowie Anteil toter Bakterien (Mittelwert) auf den Testmaterialien nach 15 h Inkubation

### 3.3.6. Zusammenfassung

Die in vitro-Untersuchungen zur Plaquebesiedlung auf praxisrelevanten Dentalmaterialien zeigen, dass:

- materialbedingte signifikante Unterschiede der Plaqueadhärenz detektiert werden können,
- auf Titan die höchste und auf Biosil L mit Abstand die geringste Plaqueakkumulation zu verzeichnen war,
- hinsichtlich der oberflächenenergetischen Werkstoffparameter auf niedrigenergetischen Oberflächen tendentiell weniger Plaquebakterien adhärieren, wobei eine niedrige Polarität der originären Materialoberfläche zur Verringerung der Plaqueadhärenz beitragen kann,
- die Prüfmethodik einschließlich der Analyseverfahren ein geeignetes Konzept für die praxisorientierte Plaqueprüfung im Rahmen einer Biokompatibilitätstestung dentaler Werkstoffe darstellt.

## 4. Diskussion

### 4.1. In vitro-Plaqueprüfung

Die Mundhöhle stellt einen Lebensraum mit idealen Voraussetzungen für das Überleben einer Vielzahl von Mikroorganismen dar. Ihre Organisation in Plaqueschichten auf natürlichen Zahnoberflächen wie auch prothetischen Materialien ist *a priori* nicht mit pathologischen Prozessen verbunden, wenn das sich ausbildende Gleichgewicht in den Plaqueschichten nicht durch äussere Faktoren wie eine ungesunde Ernährungsweise, Krankheiten, immunologische Fehlfunktionen und ungenügende Mundhygiene gestört wird [167] (siehe auch Kapitel 1). Die ständig wechselnden Umgebungsbedingungen führen jedoch in Verbindung mit einer variierenden physiologischen Fitness immer wieder zur Verschiebung der Homeostase, was zur Induktion pathologischer Plaquebildungsprozesse führen kann [5]. Der Einsatz künstlicher Materialien als Implantate, Zahnersatz und Verblendwerkstoffe birgt die Gefahr, die homeostatischen Verhältnisse deutlich zu verschieben, wenn für die Plaquebildung relevante Materialparameter wie die Oberflächentopografie und Oberflächenenergie zu einem veränderten Adhäsionsverhalten von Mikroorganismen führen [168]. Die Säureproduktion plaqueassoziiierter azidogener Bakterien spielt dabei eine besondere Rolle bei der mikrobiell induzierten Freisetzung von Materialkomponenten [15, 169-171], die Auslöser von Materialunverträglichkeiten sein können [14, 172]. Jedoch bieten künstliche Materialien auch die Möglichkeit, durch geeignete Anpassung der Oberflächenparameter, die Adhäsion und Plaquebildung zu beeinflussen. Im Wechselverhältnis des möglichen Potentials zur Plaqueverhinderung bzw. Plaqueminimierung (z.B. Nitrierung von Titan und Zirkonoxid [173, 174], Fluorid-Freisetzung aus Bonding-Materialien [175]) und der notwendigen Biokompatibilität, die insbesondere durch die zellulären Reaktionen in den angrenzenden Geweben nach direktem Kontakt bzw. indirektem Kontakt mit freigesetzten Materialkomponenten bestimmt wird [168], gilt es, einen Kompromiss zu finden. Gleichfalls tragen begleitende Maßnahmen zur Plaquereduzierung während der Mund- und Zahnpflege durch antibakterielle Agenzien in Zahncremes und Mundwässern entscheidend zur Bekämpfung pathologischer Plaquebildungsprozesse und der Steigerung der Mundhygiene bei [5, 115, 176-179].

In diesem Zusammenhang bekommt die Prüfung der Plaquebildung und der plaquebeeinflussenden Effekte eine hohe Bedeutung. Dabei sind *in vivo*-Prüfungen nur bedingt geeignet (siehe Kapitel 4.4.). Die Entwicklung von *in vitro*-Systemen zur Simulation der Plaquebildung ermöglicht den kontrollierbaren Einsatz und Konstanz definierter Ausgangsparameter (insbesondere die Art der Bakterienkultur [103], der Temperatur, des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes und Scherstress), in einigen Fällen die frei wählbare online-Messwertaufnahme der pH-Wertänderungen in der Plaque

[147] sowie die mikroskopische Beobachtung [118, 119]. In vitro-Systeme können je nach Design schnelle und kostengünstige Prüfungen realisieren [115] und bieten die freie Variation für die Untersuchung spezifischer Teilprozesse der Plaquebildung wie Effekte auf die Aktivität von Glycosyltransferasen [180], den Einfluss des Sauerstoffgehaltes, der initialen Bakterienzusammensetzung und der Fließrate auf die Plaqueausbildung [35], den Einfluss der Ionenstärke und der Hydrophobizität [181] sowie des Speichels und des Lactosegehaltes [34] auf die Coaggregation oraler Mikroorganismen [181].

Scheie [22] bewertet die in vitro-Systeme jedoch auch sehr kritisch. Es werden mehrere Punkte diskutiert, die bei der Modellierung der in vivo-Plaque die Anwendung von in vitro-Systemen einschränken können. Demnach werden in vielen in vitro-Ansätzen grundlegende Randbedingungen bei der Simulation berücksichtigt, die nicht der klinischen Situation entsprechen. Änderungen der Zusammensetzung, des pH-Wertes sowie der Ionenstärke der eingesetzten Medien (auch bei Verwendung von natürlichem Speichel als Supplement) können zur Beeinflussung adhäsiver Prozesse führen. Der Rolle des Speichels selbst als Quelle adsorbierender Oberflächenschichten auf den Zahnmaterialien wie auch der Bakterienoberfläche wird seiner Meinung nach unterschätzt. Die Maskierung von Oberflächeneigenschaften durch die Pellikelschicht führt a) zur Minimierung des Einflusses dieser Parameter auf die initiale Adhäsion, liefert b) Kalziumionen für die nichtspezifische Bindung zwischen den negativ geladenen Zahnoberflächen und den Bakterien [182] und kann c) durch Speichelkomponenten die mikrobielle Adhäsion inhibieren [183]. Auch die phänotypische Veränderung von Laborstämmen oraler Mikroorganismen mit dem Verlust wichtiger Oberflächenmerkmale wie Zellwandfortsätzen und Veränderungen der Hydrophobizität sowie die Stammspezifität bei Reaktionen sollen zur Minderung der in vivo-Relevanz beitragen [22]. Nicht zuletzt werden die interindividuellen Unterschiede der Plaquebildung und die hohe Variabilität der individuellen Plaquestrukturen in in vivo-Experimenten [99] sowie ihre zeitabhängigen Änderungen [7] als Argument gegen in vitro-Modelle angeführt. Jedoch können gerade diese Variabilitäten, die direkt im Zusammenhang mit der hohen Varianz von in vivo-Ergebnissen stehen, durch in vitro-Modelle ausgeglichen werden [103]. In vitro-Modelle können insbesondere dann ein hilfreiches Werkzeug darstellen, wenn die Plaquebildung in ihre Teilprozesse aufgesplittet wird und diese separat analysiert werden [22]. Dies gilt insbesondere für die Untersuchung des Einflusses der nichtspezifischen Kräfte und Faktoren während der initialen Adhäsionsphase und der Phase der Adhesin-Rezeptor-Interaktionen bei der Etablierung auf der Oberfläche [17, 22-24, 34, 84, 117, 118, 184-187]. In vivo-Untersuchungen zeigten, dass die mikrobielle Adhäsion die Voraussetzung für die Plaqueinitiation ist, die mikrobielle Proliferation jedoch die Plaquereifung bestimmt [99]. Scheie schlußfolgert, dass Untersuchungen zum Plaquebildungsmechanismus auf die Faktoren ausgerichtet sein sollten, die in der Phase der initialen Adhäsion bis zur Etablierung der Plaque die dominierende Rolle spielen bzw. die die mikrobielle Proliferation und Coaggregation beeinflussen. Im Rahmen dieser Zielsetzungen sind in vitro-Modelle leistungsstarke Verfahren [103], deren Ergebnisse sich aber

dem Vergleich mit in vivo-Daten stellen und an diesen gemessen werden müssen. Die experimentellen Designs von in vivo-Prüfungen unterscheiden sich jedoch teilweise erheblich. Ein Überblick über experimentelle Details klinischer Studien ist in der Arbeit von Wehle [188] aufgeführt. Der Vergleich der Literatur zu in vitro-Prüfungen zeigt, dass auch die methodischen Ansätze und die mit ihnen verbundenen Ziele der in vitro-Modellierung sehr unterschiedlich sind und ein universeller Vergleich der einzelnen verwendeten Modelle daher nicht sinnvoll ist. Nach Sissons [103] besitzen alle Kultivierungs- und Simulierungsverfahren ihre Stärken, Grenzen und Schwächen. Ein System für die Lösung aller Fragestellungen ist daher bisher nicht erkennbar.

In Chemostat-basierten Systemen werden kontrollierte Kultivierungsbedingungen für planktonische Mikroorganismenkulturen genutzt. Als Inokulum dienen sowohl Mono- wie auch definierte Mischkulturen dentaler Mikroorganismen. Die Wachstumsraten in den bakteriellen Suspensionen werden über die Nährstoffkonzentrationen limitiert. Biofilme, die sich durch den Antransport planktonischer Mikroorganismen auf Oberflächen ausbilden, werden dabei mit zunehmender Dicke des Biofilmes und der damit verbundenen Abnahme der Diffusion unabhängig von der direkten Kontrolle durch die planktonische Phase, und das Wachstum im Biofilm läuft zunehmend unkontrolliert ab [3]. Die meisten Chemostat-Systeme bieten die Möglichkeit, eine größere Anzahl an Parallelproben verschiedenster Materialoberflächen besiedeln zu lassen. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit zur Probenahme, der online-Messwertaufnahme, der Flexibilität in der Probengeometrie, der Kultivierungsbedingungen sowie der Fließbedingungen über den Oberflächen. Systeme, die Probekörper unter Submersbedingungen kultivieren, sind jedoch für eine reproduzierbare Prüfung der Plaquebildung weniger geeignet, da hier mundhöhlenuntypische turbulente Strömungen appliziert werden [22, 103]. Insbesondere für Untersuchungen zur initialen Adhäsion und Coaggregation/Coadhäsion werden daher Fließkammern eingesetzt, die mit Suspensionen oraler Mikroorganismenkulturen versorgt werden [34, 117, 118, 181, 184]. Die typischen Anwendungen von Chemostat-Systemen sind auf definierte Teilprozesse der Plaquebildung ausgerichtet.

Die „Mikrokosmos“-Modelle des CDFF und Artificial mouth verfolgen dagegen das Ziel, die Plaque unter möglichst nahen in vivo-Bedingungen unbeeinflusst wachsen zu lassen. Sie sind auf die Analyse der funktionellen Interaktionen einer Plaque ausgerichtet und erfordern Langzeitversuche bis zu einigen Wochen [103, 147, 155, 156]. Als Inokulum werden sehr oft Plaqueisolate selbst eingesetzt. Dies garantiert eine Multispezies-Plaque, wie sie unter in vivo-Bedingungen wächst [103]. Auch wenn die Fließbedingungen in diesen Systemen nicht bzw. im Falle des CDFF nur begrenzt kontrolliert werden können [134], bieten sie die Vorteile der Probenahme, der Variation von Kultivierungsbedingungen hinsichtlich der Medienvariation, der pH-Kontrolle (meist über die Zugabe von Harnstoff [103]), der Begasung sowie die Möglichkeit der parallelen Testung mehrerer Proben.

Die zwei grundlegend unterschiedlichen Ansätze zur Plaquetestung unterscheiden sich somit in der Zielsetzung und sind anwendbar, wenn sie aufgrund ihrer jeweiligen Restriktionen streng auf die jeweils fokussierten Parameter ausgerichtet sind. Es erscheint z.B. zweifelhaft, ob in vitro-Modelle mit

einer Monokultur oraler Mikroorganismen die Wirkung antibakterieller Agenzien auf die Dentalplaque [115, 189] nachweisen können, da die heterogene Struktur einer etablierten Plaque mit ihren protektiven Interaktionen eine weit höhere Resistenz gegen entsprechende Agenzien zeigt, als eine Monokultur [133, 190]. Für derartige Problemstellungen sind dann „Mikrokosmos“-Modelle den Chemostat-Systemen vorzuziehen. Die initiale Adhäsion der Mikroorganismen auf Materialoberflächen ist jedoch unabhängig von den nachfolgenden Prozessen der Plaquereifung, obwohl sie diese sehr wohl mitbestimmt [16, 17, 24, 185, 191, 192]. Die frühen Besiedler sowie ihr Potential zur Coaggregation tragen wesentlich zur initialen Plaquemasse bei, was wiederum in der Phase der Plaquereifung zu einer raschen Plaquebildung führen kann und die Gefahr einer pathologischen Plaque erhöht [32]. Mit wachsender Dicke der Plaque verlieren die Materialfaktoren jedoch zunehmend an Bedeutung und die Prozesse der Reifung werden von den Interaktionen der Bakterien untereinander bestimmt [193]. Werden die für die initiale Adhäsion dentaler Mikroorganismen wesentlichen Randbedingungen experimentell eingehalten, so ist ein in vitro-Modell geeignet, den plaquebestimmenden Teilprozess der initialen Adhäsion sowie die beeinflussenden Effekte durch Oberflächenparameter nachweisen zu können.

Die in vitro-Simulation der Plaquebildung und der mit ihr verbundenen Effekte auf Oberflächen dentaler Biomaterialien ist keineswegs neu, sondern einer der Anwendungsfälle für in vitro-Modelle der Plaquebildung. Es wurden eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt, die sich jeweils ihrer Fragestellungen sowie der angewandten Methodik unterschieden.

Eine der Hauptanwendungen stellt die Prüfung der antibakteriellen Wirksamkeit von Additiven in Zahncremes und Mundwässern dar. Hierbei steht die Plaquebildung auf verschiedenen Materialoberflächen jedoch nicht im Mittelpunkt und dient allenfalls als Hilfsmittel zur Generierung von Plaquepopulationen. So ist der Effekt antimikrobieller Agenzien wie Triclosan und Chlorhexidin auf in vitro-generierte Plaquebiofilme mit Hilfe von Hydroxylapatit, Germanium oder Amalgam als Substrate gezeigt worden. Dabei kamen sowohl der CDFF [107, 139, 140], das Modell des Artificial mouth [143], Chemostat-basierte Modelle mit Fliesskammern [116, 176, 177] sowie Submerskulturen [115, 178, 189, 194] zum Einsatz. Unter Verwendung eines modifizierten Robbins Devices (MRD) wurde an Monokulturen verschiedener *S. sanguinis*-Stämme die veränderte Suszeptibilität gegenüber Chlorhexidin im Biofilm gegenüber der planktonischen Phase nachgewiesen [195].

Intensiv untersucht wurde die initiale Adhäsion dentaler Bakterien auf Glas [117, 118, 196], silikonisierten Glasoberflächen, PTFE, Stahl und Titan [123, 124], nitriertem Titan [173, 174], Keramiken, Kompositen, Gold und Amalgam [197] und verschiedenen Dental-Keramiken [198].

Prüfungen zur Plaqueadhärenz auf verschiedenen dentalen Restaurationsmaterialien mit Hilfe eines simplen Submersverfahrens zeigten eine differierende Plaquebesiedlung auf verschiedenen Füllungsmaterialien [199] sowie weniger Plaque auf Amalgam im Vergleich zu Zementkompositen, Gold und einigen Keramiken [200]. Kouassi [201] fand einen antibakteriellen Effekt von Kalziumphosphatzement mit Hilfe der konventionellen Agardiffusionsmethode. In einer weiteren

Arbeit wurde der antibakterielle Effekt freigesetzter Kupferionen aus Glasoberflächen auf die Viabilität einer 8 Tage alten CDFF-Kultur von *Streptococcus sanguinis* gezeigt [171]. Badawi et al. [175] wies mit einem CDFF-Modell nach, dass Bonding-Materialien keinen signifikanten Einfluss auf die Plaquebildung besitzen, jedoch Fluorid-freisetzende Materialien Plaquepopulationen ohne *S. mutans* aufweisen. Ebenfalls mit Hilfe eines CDFF-Modells wurde die Korrosion intraoraler Magneten untersucht [141, 202]. In einem 30-tägigen Versuchsablauf fand man u.a., dass die Zugabe von Saccharose die Populationszusammensetzung beeinflusst und das vermehrte Auftreten acidogener Bakterien sowie die verstärkte Säureproduktion einen deutlichen Anstieg der mikrobiell induzierten Korrosion zur Folge hat.

Die Fülle der Anwendungen der in vitro-Plaqueprüfung auf die Testung von Materialeffekten macht die hohe Diversität der Testansätze deutlich. Systematische Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenenergie und Oberflächentopografie auf die Plaquebildung an der Oberfläche dentaler Biomaterialien sind jedoch nicht sehr zahlreich. Grossner-Schreiber et al. [174] testete den Einfluss von Oberflächenmodifikationen (TiN-, ZrN-Beschichtung auf Titan mittels PVD-Verfahren, thermische Oxidation und Laserstrukturierung) auf die Oberflächenrauigkeit und deren Effekt auf die Plaquebildung. Eingesetzt wurde eine Kultur aus *S. mutans* und *S. sanguinis* in einem Submersverfahren. Kawai et al. [197, 203] untersuchte den Einfluss der Rauigkeit auf Amalgam, Gold und Keramiken bis zu 24 h unter Verwendung radioaktiv markierter Bakterien. Diese Ansätze unterscheiden sich von dem Testdesign der vorliegenden Arbeit insbesondere durch die verringerte Komplexität der Inokula, die nicht kontrollierte Kultivierung der Bakteriensuspensionen sowie den Fließbedingungen. Das dieser Arbeit zugrunde liegende System ist konsequent auf die Testung der initialen Adhäsion sowie die beeinflussenden Effekte durch Oberflächenparameter als bestimmender Teilprozess der Plaquebildung ausgerichtet. Es nutzt die Vorteile Chemostat-basierter Systeme für die Bereitstellung kontrollierbarer und reproduzierbarer Testbedingungen. Die Reduktion möglicher Freiheitsgrade bei der Plaquesimulation auf ein notwendiges Minimum (definierte Mischkultur aus fünf oralen Bakterienspezies, Kurzzeitversuche) eröffnet darüber hinaus die Anwendung als Screening-Verfahren für die Prüfung des Potentials zur Plaqueakkumulation auf dentalen Biomaterialien. Insbesondere die Konstanz der biologischen Ausgangsfaktoren, die durch die Anwendung der kontinuierlichen Kultivierung jeweils frischer Bakterienmischkulturen in Bioreaktorgefäßen über den gesamten Testzeitraum gewährleistet wurde, ermöglicht den direkten Vergleich der materialoberflächeninduzierten Effekte auf die Bakterienadhäsion. Das Testdesign soll dabei eine so weit wie möglich vereinfachte Durchführung der Prüfung eines großen Probenkollektivs in vertretbaren Testzeiträumen gewährleisten. Das Feedback der Prüfung kann Empfehlungen zur Oberflächenmodifikation sowie Oberflächenbehandlung für Hersteller von Dentalwerkstoffen sowie auch Zahnärzte/Zahntechniker für entsprechende Massnahmen auf der Basis experimentell validierter Daten liefern.

## 4.2. Methodischer Vergleich mit alternativen in vitro-Verfahren

Die Anwendung replikativer bzw. investigativer Modelle für die in vitro-Plaueprüfung hängt entscheidend von der zu lösenden Fragestellung ab. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Prüfkonzept fokussiert auf die initialen Adhäsionsprozesse und nicht auf die Modellierung der komplexen Interaktionen einer biodiversen Plaue. Für die letztgenannten Fragestellungen sind die Modelle des CDFF und des Artificial mouth ausgereifte Systeme mit hoher Praxisrelevanz. Für die Untersuchung der ersten Teilprozesse der Plauebildung und deren Beeinflussung durch die Materialoberfläche weisen sie jedoch eine Komplexität auf, die im Rahmen einer schnellen Screening-Prüfung nicht notwendig ist. Insbesondere die Diversität der Inokula, die an entsprechender Stelle ihre hohe Bedeutung und Berechtigung hat, jedoch gleichfalls eine biologische Varianz aufgrund schwankender Populationszusammensetzungen mit sich bringt, der relativ lange Inkubationszeitraum, der für die Ausschöpfung des Potentials der „Mikrokosmos“-Modelle notwendig ist sowie die nur begrenzt kontrollierbaren hydrodynamischen Testbedingungen, die entscheidend für den Antransport der Mikroorganismen an die Oberfläche und die reversible Ablösung von dieser sind [17], favorisieren investigative Modelle mit klar definierten Ausgangsbedingungen.

### 4.2.1. Gerätetechnische Ausstattung

Dabei sind Chemostaten als konditionierende Gefäße für die planktonische Bakterienkultur mit Fliesskammern im Bypass von verschiedenen Gruppen eingesetzt worden. Insbesondere die Arbeitsgruppe um Busscher konnte zu einem grundlegenden Verständnis initialer Adhäsionsprozesse beitragen [17, 23, 24, 84, 95, 117, 185, 191]. Es ist nicht verwunderlich, dass die Anwendung von Fliesskammern als Inkubations- und Reaktionsraum für die initiale Adhäsion eine zentrale Rolle einnimmt [116, 117, 195, 204]. Mit ihrer Hilfe können laminare Strömungsverhältnisse, in einem weiten Bereich variierbare Scherkräfte für gezielte Ablöseversuche, die Integration verschiedener online-Messverfahren sowie aufgrund der flexiblen Geometrie und Anordnung eine Multiplikation parallel zu testender Probekörper erreicht werden. Modelle, die die Biofilmbildung unter Submersbedingungen direkt im Chemostat, wenn auch unter Anwendung einer kontinuierlichen steady-state Bakteriensuspension, favorisieren, sollten aufgrund der fehlenden kontrollierbaren Fliessbedingungen an der Materialoberfläche [205] nicht für vergleichende Untersuchungen der initialen Adhäsion eingesetzt werden.

Die eingesetzten Fliesskammern haben abweichende Designs. Hodgson et al. [204] verwendete ein Glasgefäß mit einem relativ großen Volumen, in dem in Vertiefungen die Probekörper eingelegt wurden. Herles et al. [116] setzte sechs parallel geschaltete Fliesskammer ein, die einen Fliesskanal von 0,3 cm Tiefe aufwiesen und laminare Strömungsbedingungen (Reynoldszahl: 2,2)

gewährleisteten. Die von Busscher et al. [117] entwickelte Fliesskammer besitzt einen Fliesskanal von nur 0,06 cm Tiefe, einen Medienflow von 1,5 ml/min mit Reynoldszahlen von ca. 0,2. Die von Gaffar et al. [177] eingesetzte Fliesskammer weist einen Spalt von 1,5 mm zwischen zwei parallelen Platten auf und wurde mit einem Medienflow von 1 ml/min betrieben, was einer Scherkraft von  $0,32 \text{ dyn/cm}^2$  entspricht. Unsere Fliesskammer weist einen Fliesskanal von 0,1 cm auf und stellt somit einen guten Kompromiss zwischen den beschriebenen Systemen dar. Wir konnten zeigen, dass mit einer Fliessrate von 0,3 ml/min laminare Strömungsverhältnisse (Reynoldszahl: 1,1) mit Scherkräften von  $2 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$  (auf einen einzeln adhärierten Mikroorganismus) vorliegen. Die Fliessrate korreliert mit der Ruhefliessrate von menschlichem Speichel von 0,5 ml/min [206], obwohl ein direkter Vergleich der dabei herrschenden Scherkräfte nicht uneingeschränkt möglich ist. Für die Gewährleistung reproduzierbarer Fliessbedingungen ist es weiterhin unerlässlich, das Auftreten von Gasblasen während der Inkubation im Fliesskanal zu vermeiden. Von Gaffar et al. [177] wurden die Fliesskammern vertikal gestellt. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde dagegen eine Gasblasenfalle angewandt, die vor den Fliesskammern eingesetzt wurde und die die unkontrollierte Passage von Blasen durch den Fliesskanal verhinderte.

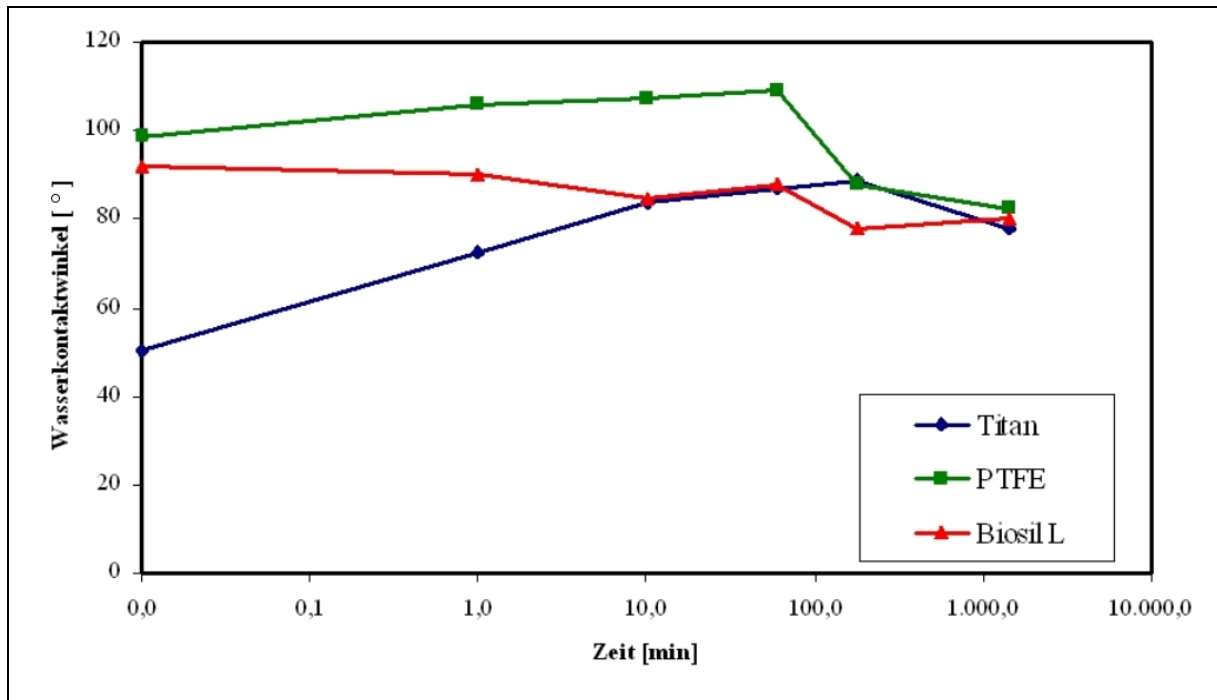
Ein wesentlicher Vorteil der eingesetzten Fliesskammern besteht in der Wahl des Materials. Für die Konstruktion wurde PEEK (Polyetheretherketon) eingesetzt. Eigene Untersuchungen zeigten, dass dieses Material eine geringere Akkumulation von Bakterien aufweist im Vergleich zu Stahl und Glas. Probleme bei längerfristigen Inkubationen hinsichtlich der unerwünschten Besiedelung des Konstruktionsmaterials der Reaktionsgefäße [205] können somit auf ein Mindestmaß beschränkt werden. Da es sterilisierbar ist, eignet es sich hervorragend für die Konstruktion von Fliesskammern für wiederholte Testserien zur Plaqueakkumulation.

#### **4.2.2. Medien und Supplemente**

Nach McKee et al. [128] besitzen die Medien in in vitro-Modellen eine hohe Bedeutung und sollten für vergleichende Untersuchungen eine möglichst definierte Zusammensetzung aufweisen [205]. In der natürlichen Mundflora wird das bakterielle Wachstum im Speichel durch die Verfügbarkeit von fermentierbaren Kohlenhydraten limitiert [207]. Eine gemischte Substratverwertung von Kohlenhydraten und Aminosäuren ist demnach essentiell für die Ausbildung einer komplexen Bakterienmischkultur unter Glucose-limitierten Wachstumsbedingungen. Erfolgreiche Chemostat-Kulturen müssen daher Glucose-Limitationen aufweisen, um das Überwachsen von Bakterienspezies mit niedriger Wachstumsrate bei gegebenem Medium in einer Mischkultur zu verhindern. In dem eingesetzten BM-Medium wurde 15 mM Saccharose zugegeben, was deutlich Kohlenhydrat-limitierten Bedingungen entspricht [128]. Durch die Verwendung von Peptonen und Hefextrakt stehen jedoch auch die notwendigen Aminosäureanteile zur Fermentierung bereit. Weiterhin sind Kalium-Ionen wichtig für die Aufrechterhaltung der metabolischen Aktivität. Natriumionen sollten vermieden



werden. Dieser Effekt geht auf die Beeinflussung des Zuckertransportes über Phosphotransferasen und die Protonenpumpen in der Zellmembran von Streptokokken bei Anwesenheit von Natriumionen zurück [208, 209]. Diese Ergebnisse konnten durch den Vergleich der Wachstumsraten der fünf Bakterienspezies in BM-Medium bestätigt werden. Die gewählten Medienbedingungen sichern somit eine stabile bakterielle Mischkultur. Durch die ermittelte Verdünnungsrate von  $0,015 \text{ h}^{-1}$ , die noch unter der von McKee eingesetzten Rate von  $0,05 \text{ h}^{-1}$  liegt, werden Kohlenhydrat-limitierte Bedingungen in der kontinuierlichen Kultur geschaffen, die eine stabile Kultivierung der Mischkultur prinzipiell bis zu mehreren Tagen/Wochen erlauben. Die Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  sowohl im konditionierenden Chemostaten wie auch den angekoppelten Fliesskammern (Temperiereinheit) entspricht der mittleren Temperatur in der Mundhöhle. Die Begasung mit einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch (95:5) liefert die notwendigen anaeroben Verhältnisse speziell für die eingesetzten Bakterienspezies. Gegenüber vielen Arbeitsgruppen [129, 137, 141, 147, 149] wurde jedoch kein Mucin (hog gastric mucin) zugegeben. Dieses aus der Magenschleimhaut von Schweinen gewonnene Produkt dient in vielen Fällen a) als Nährstoffquelle und b) als Speichersatz hinsichtlich der Glycoproteinadsorption und Pellikelbildung als konditionierender Oberflächenfilm. In Vorversuchen zeigte sich, dass die sichere quantitative Auswertung der adhärenierten Bakterien durch mikroskopische Partikel aus dem eingesetzten Mucin erheblich erschwert wurde. Der Ersatz des Mucins direkt durch menschlichen Speichel wurde fallengelassen, da die Zusammensetzung hinsichtlich der Salzionen, der Glycoproteine sowie Immunglobuline bei mehreren Spendern erheblich variieren kann [62, 210] und eine notwendige Reproduzierung für vergleichende Materialprüfungen daher nicht gegeben ist. Ein wesentlicher Punkt, der gegen die Verwendung von Speichel für vergleichende Messungen unter Nutzung einer definierten Chemostaten-Kultur spricht, ist der Gehalt von Mundhöhlenkeimen in den Speichelproben. Die Anwendung definierter Bakterienmischkulturen als Inokula für die Adhäsionsversuche (siehe unten) wird dadurch unmöglich. Gleichwohl spielt die Adsorption von Speichelkomponenten eine große Rolle bei der Vermittlung der initialen Adhäsion von Bakterien. Der Hauptanteil der Speichelproteine besteht aus Serumalbumin [62], das zur Adsorption von Speichelbestandteilen an Materialoberflächen wesentlich beiträgt und den Hauptanteil der Pellikelschicht bildet [211, 212]. Ökte et al. [210] verwendete Serumalbumin (BSA) für die Vorkonditionierung mit dem Ziel, die Standardisierung von Testbedingungen und damit die Reproduzierbarkeit zu erhöhen. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde zur Simulation des durchschnittlichen Proteingehaltes des Speichels eine Konzentration von  $0,9 \text{ g/l}$  BSA dem BM-Medium zugegeben und über die gesamte Inkubationsphase appliziert. Der Einsatz von BSA zur Simulation adsorbierender Speichelkomponenten hat den Vorteil, dass ein hinreichend reproduzierbares und kostengünstiges Produkt für die vergleichenden Materialtestungen eingesetzt werden kann. Eigene Untersuchungen zur Beeinflussung der Oberflächenenergie aufgrund der Adsorption des BSA an den Materialoberflächen zeigen, dass während der ersten Minuten der Inkubation eine rasche Adsorption von Albumin auf den Materialoberflächen stattfindet, was zu einer Angleichung der anfangs großen



**Abb. 35:** Kinetik der Albuminadsorption auf Titan, PTFE und Biosil L anhand der Beeinflussung des Wasserkontaktwinkels

Unterschiede der Oberflächenenergien führt (Abb. 35). Die Wasserkontaktwinkel als Indiz für die Oberflächenspannung streben einem Grenzwert zu. Dieser wird jedoch erst nach ca. 16 h Stunden erreicht. Die oberflächenmaskierenden Eigenschaften der Albuminschicht verringern schon frühzeitig die Differenzen der Oberflächenenergie zwischen den Materialien, so dass drastische, energetisch bedingte Unterschiede der Plaqueakkumulation bei Materialien mit sehr unterschiedlichen Oberflächenenergien nicht zu erwarten sind. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass während der Phase der initialen Adhäsion eine dynamische Änderung der vorliegenden oberflächenenergetischen Charakteristika der Materialien aufgrund der Proteinadsorption stattfindet, was eine Bewertung der Plaqueakkumulation alleine anhand der oberflächenenergetischen Materialparameter erschwert. Da unterschiedliche energetische Wechselwirkungen an der Oberfläche ihrerseits die Adsorption von Proteinen spezifisch beeinflussen können, was sich wiederum u.a. in strukturellen Änderungen der adsorbierten Proteine niederschlagen kann, sind je nach Oberfläche variierende spezifische Wechselwirkungen mit Bakterien wahrscheinlich, die mit den integralen Messwerten der Oberflächenenergie möglicherweise nicht mehr kausal zu bewerten sind.

#### 4.2.3. Bakterienkulturen

Ein wesentlicher Punkt bezüglich der Praxisrelevanz stellt die Inokulation mit Bakterien der Mundhöhle dar. Die Interaktionen zwischen Materialoberfläche und Bakterien bei der initialen Adhäsion werden von nichtspezifischen Kräften und spezifischen Wechselwirkungen bestimmt, die

ihren Ursprung in den Oberflächeneigenschaften und -strukturen beider Interaktionspartner besitzen. Wechselwirkungen können stärker bzw. schwächer ausfallen und zeigen in vielen Fällen eine Bakterienspezifität (siehe Kapitel 4.3.). Auch die Coaggregation und Coadhäsion sekundärer Besiedler auf Materialoberflächen erfordert entsprechende Inokula. In vitro-Modelle für die Prüfung initialer Adhäsionsprozesse sollten daher Mischkulturen einsetzen, müssen aber gleichzeitig aus biotechnologischer Sicht beherrschbar bleiben. Monokulturen werden fast ausschließlich für die Untersuchung stammspezifischer Adhäsionsprozesse eingesetzt. Busscher et al. [117] testete die Adhäsion verschiedener Streptokokken-Stämme auf Glassubstraten mit dem Ziel, den Einfluss der Pellikelschicht auf die Adhäsion verschiedener Streptokokkenspezies nachzuweisen. Der Einsatz von Bikulturen ist auf die Untersuchung metabolischer und kommunikativer Interaktionen zwischen zwei Spezies ausgerichtet. So wurde u.a. in einer Reihe von Arbeiten der Einfluss der Temperatur, der Ionenstärke, der Hydrophobizität und des Lactose-Gehaltes auf die Kinetik der Coaggregation zwischen verschiedenen Streptokokken und *Actinomyces naeslundii* nachgewiesen [34, 118, 181, 184]. Konsortien von vier Spezies (*S. mutans*, *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. dispar* bzw. *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. rhamnosus*, *A. naeslundii*) wurden für Untersuchungen zum Zuckermetabolismus eingesetzt. Man fand, dass Plaquebiofilme aus vier Spezies im Gegensatz zu Monokulturen in der Lage waren, kariöse Läsionen hervorzurufen [103]. Bradshaw et al. [129], Gaffar et al. [177] und Herles et al. [116] etablierten ein Bakterienkonsortium aus fünf oralen Bakterienspezies, das auch die Basis der vorliegenden Arbeit darstellt. Guggenheim et al. [194] entwickelte ein weiteres Konsortium aus fünf Spezies (*A. naeslundii*, *V. dispar*, *F. nucleatum*, *S. sobrinus*, *S. oralis*), das als supragingivales Modell eingesetzt wurde. Sechs Spezies wurden u.a. von Cutress et al. [213] verwendet. Noch komplexere Bakterienkulturen wurden von der Arbeitsgruppe um Marsh [128] etabliert. Das als „Marsh“-Konsortium bekannte Modell umfasst 9-11 Spezies (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *A. naeslundii*, *L. casei*, *Neisseria subflava*, *V. dispar*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *F. nucleatum*) und ist die Basis für viele Untersuchungen mit „Mikrokosmos“-Modellen [35, 103, 128, 137, 139]. Die bakterielle Diversität dieser für replikative Modelle angewandten Bakterienpopulationen wird nur noch von natürlichen Isolatens der Plaque-Mikroflora übertroffen, die im Modell des Artificial mouth Anwendung finden [103]. Für das in dieser Arbeit entwickelte Prüfkonzept wurde das Konsortium aus fünf Bakterienspezies gewählt, da es verschiedene Vorteile aufweist:

- Die Mischkultur ist in BM-Medium biotechnologisch beherrschbar.
- Es bietet eine im Vergleich zur natürlichen Plaqueflora ausreichende Diversität.
- Es stellt ein hinreichend adäquates System für die Untersuchung der initialen Adhäsionsprozesse dar, da sowohl Erstbesiedler (*S. sanguinis* [22, 143, 214], *S. mutans* als pathologischer Markerkeim [13]) wie auch die coaggregierende Spezies *F. nucleatum* [38] vertreten sind. Der rasch adhätierende nichtazidogene *S. sanguinis* [215] interagiert mit *S.*

*mutans*. *A. viscosus* zählt ebenso zu den frühen Besiedlern [10] und spielt eine Rolle bei der Coaggregation mit frühen Streptokokken [34].

- Cometabolische Interaktionen bei wachsender Plaqueschicht aufgrund der milchsäurefermentierenden Veillonellen [10, 153] und der damit verbundenen pH-Regulation innerhalb des Plaquefilms sind möglich.

#### **4.2.4. Bakterienkultivierung und Materialinkubation**

Die kontinuierliche Kultivierung in einem Chemostaten garantiert die Reproduzierbarkeit der Testung. Die Wachstumsraten der fünf Bakterienspezies in BM-Medium sind vergleichbar, so dass selbst bei einer längerfristigen kontinuierlichen Kultivierung (bis zu Wochen) keine deutlichen Änderungen der bakteriellen Zusammensetzung der Bakterienmischkultur auftraten (Ergebnisse einer ersten Ausbaustufe). Das in vitro-Modell ermöglicht somit aus mikrobiologischer Sicht reproduzierbare quasi-Langzeitkultivierungen. Allerdings wird durch die angewendete separate kontinuierliche Kultivierung von Reinkulturen der verwendeten Spezies mit Herstellung der Mischkulturen direkt vor den Plaqueprüfungen die Reproduzierbarkeit der Testung aus mikrobiologischer Sicht nochmals erhöht. Die bei McKee et al. [128] beschriebenen Schwierigkeiten bei der Etablierung einer stabilen definierten Mischkultur oraler Bakterien in einer ersten batch-Phase können somit vermieden werden. Weiterhin können im Sinne eines für Screening-Testungen verfügbaren Prüfdesigns auftretende Störungen (z.B. nicht ganz auszuschließende Kontaminationen einzelner Kulturen) auf ein Mindestmaß beschränkt werden. Insofern unterscheidet sich der logistische Ablauf des Prüfsystems von allen anderen vorgestellten in vitro-Verfahren.

Die Inkubationszeit für in vitro-Testungen unterscheidet sich deutlich je nach verwendetem Modell und Fragestellung. Für die „Mikrokosmos“-Modelle wird im Allgemeinen eine lange Inkubationszeit von Tagen bis Wochen angewandt, da hier die Generierung reifer Plaquebiofilme im Vordergrund steht. Für CDFF-Kulturen wurden beispielsweise 100 Stunden Kultivierung angegeben, bis sich ein gewünschtes steady-state-Gleichgewicht der generierten Plaque ausbildet, wobei die Experimente bis 840 Stunden ausgedehnt wurden [137]. Für investigative Modelle werden deutlich kürzere Inkubationszeiten von Minuten [117] bis 2-3 Tagen [116, 189, 195] angewandt. Bowden [205] fand nach 24 Stunden eine Plaqueakkumulation von einigen Bakterien-schichten auf Materialoberflächen. In den ersten 4 Stunden der Inkubation adhäreren Bakterien an der Oberfläche ohne zu wachsen. Anschließend wachsen sie oft mit einer höheren Teilungsrate verglichen mit der planktonischen Phase und tragen durch Zellteilung deutlich zur Akkumulation der Plaque bei. Busscher et al. [117] untersuchte die Kinetik der initialen Adhäsion auf Glassubstraten und die Beeinflussung durch Speichelfilme im Minutentakt. Hierbei wurde die notwendige hohe Datenmenge mittels online-Bildanalyse gewonnen. Für die Testung der initialen Adhäsion an nichtdurchstrahlbaren Biomaterialoberflächen ist ein Prüfregime im Minutentakt nicht möglich. Aufgrund der während der

Adhäsion zeitlich gestaffelten Interaktionen zwischen Bakterien und der Oberfläche sowie zwischen Bakterien untereinander sowie nicht zuletzt der klinisch relevanten Expositionszeiten von Materialien in der Mundhöhle wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Strategien verfolgt:

- Testung über 89 Stunden zum Nachweis der Plaquebildung unter Beeinflussung durch oberflächentopografische und oberflächenenergetische Materialparameter während der frühen Plaquebildungsphase sowie
- Testung über 15 Stunden zum Nachweis der Initialbesiedlung an praxisrelevanten Dentalwerkstoffen

Die Testung über 89 Stunden stellt keine typische Prüfung der initialen Adhäsion dar. Die Ergebnisse an Titan, Gold und PTFE zeigen jedoch materialspezifische Unterschiede der akkumulierten Plaquebakterienmenge trotz Nivellierung der energetischen Materialunterschiede durch die Proteinadsorption auf den Oberflächen während der Testungen und werden im Kapitel 4.3. noch ausführlicher diskutiert. Der deutlich verkürzte Inkubationszeitraum von 15 Stunden für die praxisrelevanten Dentalwerkstoffe entspricht einer klinisch relevanten Expositionszeit von Dentalwerkstoffen in der Mundhöhle zwischen zwei Zyklen der normalen Zahnpflege und wurde auch für in vivo-Untersuchungen angewandt [188, 216]. Interessant ist dabei, dass die Gesamtzahl der nachgewiesenen adhären Bakterien nach 89 Stunden geringer ist, als nach 15 Stunden Inkubation. Nach 89 Stunden konnten bei Titan als vergleichender Referenz ca.  $10^6$  Bakterien/cm<sup>2</sup> nachgewiesen werden, nach 15 Stunden jedoch ca.  $4 \times 10^8$  Bakterien/cm<sup>2</sup>. Diese Diskrepanz wird durch zwei voneinander unabhängige Faktoren interpretierbar:

Für die Untersuchungen mit 89 h Inkubation wurde zur Zellanfärbung für die quantitative Bestimmung DAPI verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und wird routinemäßig für viele Fluoreszenzanwendungen wie z.B. die FISH-Technik eingesetzt. Walberg et al [217] beschreibt jedoch eine Verringerung der DAPI-Aufnahme bei Bakterien ohne Fixierung. Da eine Ethanol-Fixierung zeitaufwendig ist sowie zum Verlust und zur Aggregation von Bakterien führen kann, was wiederum die quantitative Zählung am Fluoreszenzmikroskop beeinträchtigt, wurde auf eine Fixierung verzichtet. Dies kann jedoch wiederum zur Verringerung der quantitativ nachweisbaren Bakterien führen und eine Ursache der verringerten Bakterienzahl darstellen. Für die Versuche über 15 Stunden wurde daher konsequenterweise eine alternative Fluoreszenzfärbemethode angewandt (LIVE/DEAD® BacLight™).

Bei Busscher et al. [17, 117] wird auf einen weiteren methodischen Aspekt hingewiesen, der die Beeinflussung der Bakterienadhäsion durch die Pellikelschicht betrifft. Demnach stellen die adsorbierten Komponenten des Speichels das schwächste Glied in der Kette der adhäsionsbeeinflussenden Komponenten dar. Man fand, dass die Adhäsion von Mikroorganismen stammspezifisch unterschiedlich ist an reinen, unmodifizierten Materialoberflächen, jedoch an

pellikelbedeckten Proben geringer wird und keine Stammspezifität zeigt. Daraus wurde die Bedeutung der Pellikelschicht als bestimmender Faktor der irreversiblen Adhäsion an Oberflächen abgeleitet. Methodisch wurde vorgeschlagen, zum Ende der Inkubationsphase vor der quantitativen Analyse adhärierter Bakterien eine Luftblase durch den Fliesskanal zu leiten, was zu einer Erhöhung der Ablösekraft auf ca.  $10^{-7}$  N führt und höher ist, als die mittlere Adhäsionskraft der meisten Bakterien zu Substratoberflächen [218]. Nicht irreversibel bzw. schwach adhärierte Bakterien, die auch unter in vivo-Bedingungen leicht weggespült werden, können so auch unter in vitro-Bedingungen entfernt werden. In unseren Untersuchungen wurden direkt nach Inkubationsende Spülschritte durchgeführt, die diesem Aspekt Rechnung tragen. Die Abscherung wachsender Biofilme in situ kann demnach jedoch auch mit zunehmender Adsorption von Proteinen steigen. Die Untersuchungen zur Kinetik der Albuminadsorption zeigen, dass die Zunahme adsorbierter Proteine bis mindestens 24 Stunden anhält, so dass in den Untersuchungen über 89 Stunden ein Verlust von Bakterien auf den Oberflächen durch Abscherung der schwachen Bindung in der Proteinschicht wahrscheinlich ist. Nach 89 Stunden wären dann „nur“ noch festanhaftende Bakterien nachweisbar, die über Protein-Zellbindungen spezifisch interagieren [117]. Insofern stellt die Verkürzung der Inkubationsphase sowohl eine Erhöhung der klinischen Relevanz wie auch eine methodische Notwendigkeit zur Testung der initialen Adhäsionsprozesse von Bakterien unter Beeinflussung durch Oberflächenparameter dar.

#### **4.2.5. Quantitative Analyse der Zahl adhärierter Mikroorganismen**

Für die quantitative Bestimmung der adhärierten Mikroorganismen ist die hundertprozentige Ablösung von den Probekörper nach Inkubation eine unbedingte Voraussetzung. In den Untersuchungen wurde dafür die Ablösung mit Ultraschall angewandt. Es existieren unterschiedliche Auffassungen zur Anwendbarkeit dieser Methode. McLean et al. [219] diskutiert die Zerstörung von Zellen durch Zellwandschädigung und Hitzeentwicklung bei nichtgeeigneter Wahl der Energie der Ultraschallbehandlung. Costerton [220] führt eine Verringerung der Zahl nachweisbarer Mikroorganismen nach Ultraschallbehandlung und Vereinzelung mittels Vortex-Mischer an. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten jedoch, dass eine Ablösung mittels Ultraschallbad bei mittlerer Stärke des verwendeten Gerätes (die Höhe der dabei eingetragenen Energie kann jedoch nicht exakt angegeben werden) sowohl eine vollständige Entfernung der Bakterien ermöglichte, was durch jeweilige Gegenfärbungen mit LIVE/DEAD® BacLight™ und Fluoreszenzmikroskopie geprüft wurde sowie eine Zerstörung der Bakterien verhinderte (Vergleich suspendierter Bakterien mit LIVE/DEAD® BacLight™ vor und nach Ultraschallbehandlung). Dies wird durch Qian et al. [221], Johnson et. al [222] und Döring [189] bestätigt. Die Vereinzelung möglicher Bakterienaggregate, die für die quantitative Bestimmung ungeeignet sind, erfolgte mittels Vortex-Mischer, wobei nur eine sehr kurze Applikation bis ca. 5 Sekunden notwendig war.

Die quantitativen Ergebnisse zeigen, dass die durchschnittliche Menge adhärierter Plaquebakterien zwischen  $1 \times 10^6$  und  $4 \times 10^8$  Bakterien/cm<sup>2</sup> beträgt. In Untersuchungen zur Plaqueakkumulation wurden vergleichbare Werte gefunden, die zwischen  $1 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> und  $5 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> nach 20 Stunden Inkubation liegen [205]. Eine Erhöhung der Inkubationszeit bis zu 5 Tagen (unter nichtdefinierten Fliessbedingungen) führte zu einer Zunahme bis  $3 \times 10^7$ /cm<sup>2</sup>. Andere Untersuchungen zeigten eine Besiedlung von  $4,4 \times 10^5$  Bakterien/cm<sup>2</sup> [195], wobei diese Werte die kolonieformenden Einheiten (cfu) darstellen und tote Bakterien des Biofilmes nicht erfasst werden. Somit ist eine höhere Gesamtzahl adhärierter Bakterien auch hier wahrscheinlich. Die Zahl auf Glas adhärierter Bakterien nach 6 Stunden unter Fliessbedingungen betrug zwischen  $10^6$  und  $10^7$ /cm<sup>2</sup> [117, 118]. Ausgehend von dem Ziel, ein in vitro-Modell zu entwickeln, dass für die vergleichende Prüfung der Plaqueakkumulation dentaler Werkstoffe ausgelegt ist und ein Ranking der Materialien bezüglich ihrer Plaqueakkumulation erlaubt, hat die absolute Zahl adhärierter Bakterien auf den Oberflächen jedoch nur eine untergeordnete Bedeutung. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung adhärierter Bakterien auf den praxisrelevanten Dentalwerkstoffen Titan, Degunorm, Definite, Duceragold und Biosil L zeigen, dass das Ranking bezüglich der Plaqueakkumulation (Titan > Degunorm > Definite > Duceragold > Biosil L) mit vergleichenden in vivo-Studien übereinstimmt ([188], siehe Kapitel 4.4.), auch wenn die Gesamtzahl der nachgewiesenen Bakterien auf den Oberflächen in den vergleichenden in vitro- und in vivo-Studien differiert.

Auf den Proben nach 89 wie auch nach 15 Stunden Inkubation wurden vorwiegend die typischen Erstbesiedler der dentalen Plaque gefunden. Streptokokken überwiegen, gefolgt von Actinomyceten. Hierbei spielen offensichtlich coadhäsive Prozesse zwischen diesen Spezies eine Rolle [34, 118]. Der mittlere Anteil initial adhärierender Streptokokken beträgt ca. 70-73%, der Anteil an Actinomyceten ca. 25%, was einer vivo-ähnlichen Situation in der frühen Plaquebildungsphase entspricht [3]. Auf Gold wurde anfänglich (41 h) ein erhöhter Anteil Actinomyceten nachgewiesen, der nach 89 Stunden Inkubation wieder zugunsten der Streptokokken sank. Inwieweit hierbei auf einen materialspezifischen Effekt geschlossen werden kann, ist unklar. Jedoch verringerte sich in einer Arbeit von Skopek et al. [223] der Anteil an Actinomyceten auf coaggregierenden Streptokokken nach 24 Stunden deutlich, was mit veränderlichen Umweltfaktoren in Verbindung gebracht wird. Nyvad et al. [224] nennt für in vivo-Proben einen Anteil von 10% für Actinomyceten und fand gleichfalls eine Verringerung dieses Anteils in der frühen Plaquebildungsphase, was auf die Verlängerung der lag-Phase bzw. auf eine niedrige Wachstumsrate dieser Bakterien zurückgeführt wurde. Regelmäßig finden sich Fusobakterien auf den Proben (insbesondere auf Titan), die ansatzweise typische „corn-cob“-Strukturen mit Streptokokken bilden. Die Ausnahmen stellen die Materialien Duceragold und Biosil L dar, auf denen nach 15 Stunden Inkubation fast keine Anteile an Fusobakterien nachweisbar waren. Diese zwei Materialien weisen im Vergleich mit den weiteren praxisrelevanten Dentalwerkstoffen Definite, Degunorm und Titan jedoch auch eine reduzierte Plaqueakkumulation auf. Aufgrund der besonderen Bedeutung von *F. nucleatum* als coaggregierender Oralkeim für die

Biofilmbildung und Struktur [36, 38, 42] ist aus mikrobiologischer Sicht die verringerte Plaqueakkumulation auf diesen Materialien interpretierbar. Es bleibt offen, ob materialspezifische Effekte zur Reduzierung von Fusobakterien auf diesen Oberflächen beitragen. Veillonellen sind nur sehr vereinzelt auf den Proben nachweisbar. Als typische Spätbesiedler einer Plaque und Säurefermentierer bieten die Plaquekonsortien auf den untersuchten Materialien offenbar nicht die geeigneten Voraussetzungen für eine feste Etablierung in den Plaqueschichten.

Die Bestimmung der Spezieszusammensetzung mittels Selektivagarnährböden im Vergleich zur Gesamtzahl akkumulierter Bakterien zeigt, dass die Materialeffekte einen Einfluss auf die Plaquemenge besitzen, jedoch nicht auf die Spezieszusammensetzung. Ähnliche Ergebnisse wurden von Goodson et al. [225] beschrieben. Inwieweit die oberflächenenergetischen Materialparameter die qualitative Zusammensetzung der Plaquebiofilme beeinflussen können, ist jedoch noch nicht geklärt [192]. Verlässliche Informationen dazu könnten einen Anhaltspunkt zur gezielten Reduzierung pathologischer Plaquebakterien darstellen und damit einen großen Beitrag zur Bekämpfung der plaqueinduzierten Gesundheitsschäden leisten.

Auffällig war, dass bei den ursprünglich hydrophoberen Materialien PTFE und Biosil L die Plaquebesiedlung nicht homogen war. Hier treten vor allem an Fehlstellen der Oberflächentopografie akkumulierte Bakterien auf, was auf den Einfluss der Oberflächentopografie auf die Initialadhäsion schließen lässt. Im Gegensatz dazu konnten auf Degunorm und Duceragold ausgedehnte, homogen verteilte Streptokokkenrasen detektiert werden, was der in vivo-Situation entspricht, nach der adhärierte Frühbesiedler sich rasch teilen und sehr rasch einen konfluenten Plaquefilm verschiedener Dicke bilden [226]. Auffallend ist, dass auf Biosil L nach Ultraschallablösung adhärierter Bakterien Rückstände verbleiben. Nach Gilbert et al. [227] können dies Rückstände von EPS-Matrixsubstanzen sein, die trotz Ultraschall irreversibel an der Oberfläche verbleiben. Offensichtlich favorisiert die stark hydrophobe Oberfläche von Biosil L die Bindung der langkettigen EPS.

Das Verhältnis lebender zu toter Bakterien kann ein Indikator für materialinduzierte Plaquebeeinflussungen sein. So wurden u.a. die Effekte von Triclosan und Chlorhexidin auf die Vitalität dentaler Bakterien [194], die Wirkung von Kupfer auf *S. sanguinis*-Biofilme [138] sowie die räumliche Verteilung lebender und toter Bakterien in einer „Mikrokosmos“-Plaque [171] mittels fluoreszenter Lebend-/Totfärbungen registriert. In den vorliegenden Versuchen konnten keine deutlichen Verschiebungen des Leben-/Tot-Verhältnisses in Abhängigkeit der untersuchten Materialien detektiert werden. Demnach sind auf allen Materialien ca. 2/3 der adhärierten Bakterien vital (mit Ausnahme von Definite, bei dem eine leichte Erhöhung des Lebendanteils zu verzeichnen war).



#### 4.2.6. Weitere Verfahren zur Bewertung der Plaqueadhärenz

Für die qualitative und quantitative Bewertung der akkumulierten Plaquebiofilme steht im Prinzip eine Vielzahl an Analyseverfahren zur Verfügung. Dabei können einige Verfahren direkt an den Inkubationsprozess gekoppelt werden, um direkt am Ort der Plaquebildung Informationen durch entsprechende Sonden (im weitesten Sinne) abzugreifen. Der wesentliche Vorteil dieser online-Messverfahren besteht in der Detektion plaquerelevanter Parameter ohne Beeinflussung des Inkubationsprozesses und erlaubt u.a. unter bestimmten Voraussetzungen die Analyse der Adhäsionskinetik akkumulierender Biofilme. Die mikroskopische Bildanalyse stellt ein klassisches Beispiel einer online-Analyse dar. Sie ist ohne kostenintensiven Aufwand durch die Integration von optischen Fenstern in Fließkammern möglich. Mittels online-Analyse wurde von Busscher et al. [117] die Kinetik der Adhäsion verschiedener Streptokokkenstämme auf Glas getestet. Die große Datenmenge erlaubte hier eine sehr genaue Detektion des Einflusses von Speichelsubstraten auf die initiale Adhäsion. Die Bildanalyse lieferte interessante Daten zur Coadhäsion initialer Besiedler [34, 118]. Jedoch wird hier auch ein Problem der online-Mikroskopie deutlich. Die meisten Biomaterialien sind nichtdurchstrahlbar, so dass keine ausreichende Kontrastierung der Bakterien durch den üblich verwendeten Phasenkontrast erfolgt. Techniken der Reflexionsmessung liefern ohne Fluoreszenzmarkierung nur unzureichende Informationen, die keine sichere online-Analyse ermöglichen. Eine interessante Anwendung der online-Mikroskopie an undurchstrahlbaren Materialien wie Amalgam, PMMA, Gold und Keramiken wurde jedoch bei Tullberg [228] beschrieben. Er testete die Adhäsionskraft von Artificial mouth-Konsortien mit Hilfe eines abscherenden Medienstrahles. Die Ablösung beobachtete er mit Hilfe einer Kamera direkt auf der Probe und registrierte die Stärke des für die Ablösung notwendigen hydrodynamischen Druckes. Durch die Aufnahme der Plaquekonsortien aus verschiedenen Richtungen konnten Stereobilder erzeugt werden, die eine Vermessung der Plaquedicke erlaubten. Eine Alternative zur klassischen Lichtmikroskopie stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar, die in der Biofilmforschung eine herausragende Bedeutung erlangt hat. Für online-Verfahren sind Markierungen mittels des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP bzw. seine Modifizierungen BFP, RFP u.a.), das 1994 in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt wurde, eine elegante Möglichkeit, die räumliche Verteilung sowie funktionelle Interaktionen in Biofilmen zu visualisieren [229]. Von Aspiras et al. [230] wurde erstmals die GFP-Expression in Streptokokken sowie die Anwendung zur Untersuchung coadhäsiver Prozesse in Biofilmen mittels Fließkammerversuche gezeigt. Wang et al. [231] wies nach, dass die Fusion mit Proteinen die fluoreszierenden Eigenschaften von GFP nicht verändert, was die Detektionsmöglichkeiten spezifischer Zellprozesse noch deutlich erhöht. Mit GFP-Konstrukten konnte Yoshida et al. [232] z.B. die Regulation der Glycosyltransferase und genregulatorische Prozesse in *S. mutans* mittels Kopplung von CLSM, Flowcytometrie und Real Time-PCR (RT-PCR) zeigen.

Eine weitere Möglichkeit, die Kinetik der Biofilmbildung online zu analysieren, stellt die FTIR-Spektroskopie dar. Dabei werden z.B. ATR-Kristalle (Attenuated Total Reflection) in Fließkammern integriert und die Zunahme der akkumulierten Biomasse über die Detektion der Amidbanden des FTIR-Spektrums im Bereich von ca.  $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  detektiert [163]. Die online-Detektion über die ATR-FTIR-Technik ist jedoch nur an den Oberflächen der Germanium-Kristalle selbst möglich [177]. Der Einfluss von Oberflächenparametern von Biomaterialien auf die Plaquebildung kann damit nicht direkt getestet werden.

Die pH-Messung direkt in Artificial mouth-Konsortien über pH-Sonden [147] erweitert die online-Analysemöglichkeiten der Plaquebildung und -reifung.

Für die offline-Analyse der akkumulierten Plaquebiofilme wurde eine breite Palette an Methoden beschrieben. Dazu zählen natürlich die klassischen Agar-Techniken mit nichtselektiven und selektiven Agarnährböden zur quantitativen Bestimmung. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass aufgrund der Kultivierbarkeit nur eine eingeschränkte Zahl an Bakterien nachgewiesen wird. Dagegen ermöglicht die Färbung der Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen (u.a. FITC, Ethidiumbromid, Acridinorange, Propidiumjodid, Syto-Farbstoffe) sowie ihrer Kombination untereinander eine Vielzahl an spezifischen und nichtspezifischen Markierungen und erlaubt den direkten Nachweis von Bakterien auf Oberflächen und in Suspensionen ohne notwendige Subkultivierung. Davon profitiert insbesondere das Laserrasterverfahren der CLSM. Neben den GFP-basierten Methoden spielt die Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen eine wichtige Rolle für die Untersuchungen zum Verständnis der räumlichen Struktur, der Funktion, der Kommunikation und Diversität innerhalb von Biofilmen [18, 25, 66, 67, 138, 194, 233]. Selektive Lebend-Tot-Färbungen mit CLSM-Analyse wurden beispielsweise zur Bestimmung von Antiplaqueagenzien eingesetzt [190, 194]. Hierbei ist jedoch zu prüfen, inwieweit die vorliegende Bakterienpopulation sich vollständig anfärben lässt. Insbesondere bei Wildstämmen aus in vivo-Proben ist eine Markierung aller Bakterienspezies nicht immer gegeben und schränkt hier die Anwendbarkeit ein (siehe auch Kapitel 4.4.). Die Fluoreszenzmarkierung von Bakterien wurden eingesetzt, um die Kolonisierung, Mikrostruktur und molekulare Transportprozesse in fließkammergenerierten Plaquebiofilmen zu untersuchen [119]. Durch die Anwendung von Fluoreszenzimmunoassays wurde die Möglichkeit zur automatischen Bildanalyse und Identifizierung von Bakterienspezies in supragingivalen Dentalplaques gezeigt [234].

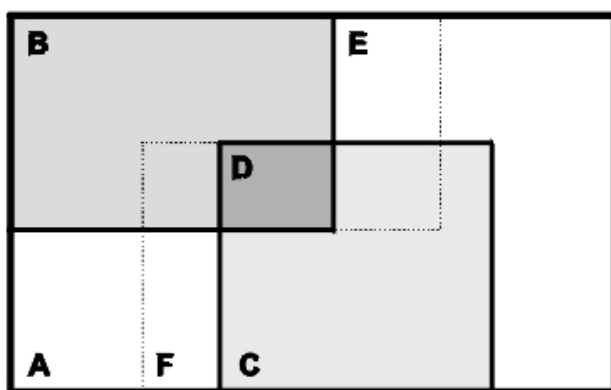
Die Anwendung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) erweitert die mikroskopischen Fluoreszenztechniken durch molekularbiologische Methoden. Über die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Eubakterien- bzw. speziesspezifischen Oligonukleotiden kann dadurch der Nachweis einzelner Bakterienspezies innerhalb von Plaquebiofilmen geführt werden [235]. Die PCR-Technik stellt ein weiteres Tool für die speziesspezifische Analyse von Plaquebakterien dar [206].

Eine sehr sensitive Methode zum quantitativen Nachweis akkumulierter Bakterien besteht in der Anwendung radioaktiv markierter Bakterien. [162, 236, 237], falls ein entsprechend ausgerüstetes Labor vorliegt. Von Kinniment wurde die Methode der Vitalfärbung an Kryoschnitten etabliert [135].

An Proben mit generierten Plaquebiofilmen wurde offline die Menge der akkumulierter Plaque mit Hilfe der ATR-FTIR-Technik sowie Ellipsometrie (Dickenmessung) analysiert [238] und die Beeinflussung der Plaque durch Antiplaqueagenzien gezeigt [177]. Die Wirkung von elektrischen Zahnbürsten auf die Entfernung adhärierter Plaqueschichten wurde durch Bildanalyse entsprechender Probenareale nachgewiesen [239].

Für strukturelle und ultrastrukturelle Untersuchungen an Plaquebiofilmen wird traditionell die REM-Analyse sowie die Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt [96, 98, 99, 132, 210, 236, 240-248]. Aufgrund der Präparation entsprechender Proben für die REM-Analyse durch Trocknungsschritte und Besputterung bestehen jedoch berechtigte Bedenken, inwieweit die REM-Bilder die exakte Struktur der Plaquebiofilme wiedergeben. Artefakte insbesondere der Plaquematrix sowie der Verringerung der räumlichen Ausdehnung infolge des Entzugs des Wasseranteils sind bei der Interpretation der Bilder einzukalkulieren. Die Aufarbeitungsartefakte sind durch die Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) zu vermeiden. Nicht zuletzt durch die eingeschränkte Verfügbarkeit dieser Technik existieren jedoch ausser Untersuchungen zur Materialstruktur von Zahnschmelz und deren Beeinflussung durch Säuren [249] noch keine ausgedehnten Untersuchungen an Plaquebiofilmen.

Die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Analysemethoden zeigt, dass sie sich a) durch ihren methodischen und apparativen Aufwand und b) durch ihre Aussagekraft unterscheiden. Bei der Wahl geeigneter Verfahren sollte ebenso auf eine möglichst hohe synergistische Wirkung der Ergebnisse geachtet werden. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 36 für die Anwendung unterschiedlicher Methodiken für die Bestimmung der bakteriellen Population mittels konventioneller und gentechnischer Bestimmungstechniken gegeben.



**Abb. 36:** Beispiel der Detektion einer bakteriellen Population mittels konventioneller und gentechnischer Methoden. A: Gesamtpopulation, B: Agar-Kulturtechniken, C: Klonierung, D: Schnittmenge aus B und C, E: mögliche Verbesserung der Agarkultivierung durch Selektivnährböden, F: mögliche Verbesserung der Klontechniken durch Variation von Primern und Anzahl der PCR-Zyklen (nach Pratten et al. [206])

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Spektrum von Analysemethoden gewählt, das sowohl qualitative wie auch quantitative Bewertungen der akkumulierten Plaquefilme erlaubt. Die Verfahren reflektieren dabei nicht nur das Spektrum erfolgreich eingesetzter Methoden, sondern sind auch mit vertretbarem Aufwand für screenende Prüfungen der Plaqueakkumulation auf Dentalwerkstoffen und eine repräsentative Bewertung der initialen Bakterienadhäsion geeignet.

Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Dadurch wird zum einen eine Subkultivierung zu analysierender Bakterienzahlen mit den damit verbundenen möglichen Fehlerquellen (Pipettierverluste, Wachstumslimitation auf verschiedenen Agarnährböden, Kontaminationen) und dem erhöhten Zeit- und Materialaufwand vermieden. Es zeigte sich, dass mit Hilfe des LIVE/DEAD® BacLight™-Kits optimale Markierungsvoraussetzungen für die eingesetzte Bakterienpopulation vorlagen. Dadurch war die Bestimmung der Gesamtzahl der akkumulierten Bakterienpopulation unabhängig von ihrer Vitalität innerhalb des Plaquefilmes möglich. Die Bestimmung einzelner Spezies über Selektivagarnährböden gestaltete sich dagegen relativ schwierig. Für die Streptokokken-Spezies wie auch *Veillonella* konnten eindeutig auswertbare Einzelkolonien auf Verdünnungsausstrichen generiert werden, was für *Actinomyces* und *Fusobacterium* nur eingeschränkt möglich war. Hier sind wahrscheinlich die FISH-Technik bzw. PCR-Techniken besser geeignet, die jedoch den Aufwand für screenende Prüfungen eines größeren Probenkollektivs unzulässig erhöhen würden. Im Rahmen einer Screening-Prüfung erscheint jedoch die Bestimmung der Gesamtzahl akkumulierter Bakterien als ausreichend, so dass die speziesspezifische Analyse detaillierteren Prüfungen vorbehalten bleiben sollte.

Die REM-Analyse liefert eine gute Korrelation zur quantitativen Analyse anhand der Einschätzung der Flächenbedeckung. Als halbquantitatives Verfahren kann sie daher quantitative Daten bestätigen. Zusätzliche Informationen sind durch die Einschätzung der Struktur der Plaquebiofilme gegeben. Wenngleich die Aufarbeitungsmethodik direkte Rückschlüsse auf die interne Strukturierung der Bakterien-schichten nur eingeschränkt zulässt, sind teilweise eindrucksvolle Einblicke zur Mehrschichtigkeit der akkumulierten Plaque und der interbakteriellen Kommunikation („corn-cob“-ähnliche Strukturen [39]) möglich. Die Produktion von EPS-Substanzen kann über das Auftreten der typischen Geflechte der Trocknungsartefakte aus den REM-Bildern abgelesen werden und liefert Hinweise auf plaqueähnliche Strukturierungsprozesse.

Die Bedeutung der CLSM für die Analyse von Biofilmen ist bereits genannt worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Untersuchungen zur Struktur der in vitro-Plaquefilme durchgeführt. Die für diese Arbeit angewandte Lebend-/Tot-Färbung mittels LIVE/DEAD® BacLight™ stellt dabei nur einen ersten Schritt hin zu einer detaillierteren Analyse dar. Neben der 3D-Rekonstruktion der räumlichen Verteilung akkumulierter Bakterien auf den Oberflächen konnte gezeigt werden, dass der Anteil toter Bakterien in den inneren Schichten der Plaqueaggregationen höher ist, als in den peripheren Arealen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hope et al. [138], Netuschil et al. [25] und Aushill [233]. Jedoch wurden keine erhöhten Anteile toter gegenüber lebenden Bakterien gefunden, wie sie für frühe Plaques beschrieben wurden [25]. Die CLSM-Aufnahmen bestätigen eher die quantitativen Bestimmungen zum Lebend-/Tot-Verhältnis innerhalb der Plaque, wonach ca. 65% lebende Bakterien sowie 35% tote Bakterien die bakterielle Plaquegesamtmasse bilden. Weiterhin deuten sich strukturelle Differenzierungen in den akkumulierten Plaquefilmen an. Dazu gehört die Ausbildung von Kanälen, die bei Wood et al. [66] beschrieben sind, wenngleich die analysierten

Proben nicht die funktionelle räumliche Differenzierung einer reifen Plaque aufweisen, was u.a. dem relativ jungen Alter der Plaquebiofilme (89 h) zuzuschreiben ist. Auch die in den REM-Analysen gefundenen „corncob“-Strukturen sind im CLSM deutlich zu sehen. Diese auf die Coaggregation von Fusobakterien und Streptokokken zurückgehenden Komplexe von unterschiedlichen Spezies mit metabolischer Funktion zeigen, dass mit dem in vitro-System durchaus plaqueähnliche Strukturen generiert werden können, auch wenn das System auf die Prüfung initialer Plaqueadhäsionsprozesse ausgelegt ist und dass die Integration der CLSM als offline, wie auch online-Verfahren (bei der Wahl geeigneter vitaler Fluoreszenz-Kontrastierungsverfahren bzw. GFP-markierter Modellorganismen) strukturelle Daten liefern kann, die eine funktionelle Analyse der Plaquekonsortien und ihre Beeinflussungen durch Materialparameter ermöglichen.

Die FTIR-Spektroskopie dagegen liefert biochemische Strukturdaten, die a) für eine halbquantitative Bestimmung der akkumulierten Plaqueschicht anhand der Integration bakterienproteinassoziierter Amidpeaks und deren Integration und b) für die Einschätzung der Menge synthetisierter EPS-Substanzen innerhalb des Plaquebiofilmes geeignet sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine halbquantitative Bestimmung der akkumulierten Plaquemenge über die Amidbanden möglich ist. Die qualitativen Ergebnisse der REM-Analyse werden bestätigt. Anhand der Spektren der praxisrelevanten Dentalwerkstoffe, für die ein Spektrenbereich von  $800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen wurde, ist die plaqueassoziierte Produktion von EPS-Substanzen zu erkennen. Demzufolge korreliert die EPS-Menge mit der Plaquemenge. Für die quantitative Bewertung mit Hilfe der Integration der Amidbanden der auf der Oberfläche akkumulierten Bakterien (durchgeführt für den Vergleich der Plaqueakkumulation auf Titan und Gold) ist jedoch das zugrundeliegende Modell (setzen der Peakgrenzen) entscheidend und eine mögliche Fehlerquelle. Die quantitativen Daten können somit Tendenzen aufzeigen, jedoch sollten bei einem direkten quantitativen Vergleich die Daten mit Vorsicht behandelt werden, nicht zuletzt aufgrund der Überlagerung von Substanzpeaks in einem multifaktoriellen biologischen Umfeld wie der Dentalplaque. Für die FTIR-Analyse besitzt jedoch das Trocknungsverfahren, im Gegensatz zur REM, keine Bedeutung, da hier vordergründlich das Auftreten eines Analyts von Interesse ist und nicht seine Strukturierung.

Ein experimenteller Ansatz, der die Kombination verschiedener Analyseverfahren zur Bewertung der Plaqueakkumulation und beeinflussender Faktoren enthält, wurde von Gaffar et al. [177] beschrieben. Hierbei wurden Germanium-Kristalle in Fliesskammern integriert und die akkumulierte Plaquemenge nach Inkubation „offline“ analysiert und mit quantitativen Daten zur Plaqueakkumulatuion verglichen. Sein System wurde als Screening-Tool für die Untersuchung der Wirksamkeit von Antiplaquemitteln in Mundwässern eingesetzt. Die Plaquegenerierung wurde hier mit neun Bakterienstämmen an Hydroxylapatit-Körpern durchgeführt, die anschließend der Wirkung antibakterieller Agenzien ausgesetzt waren. Die quantitative Analyse erfolgte über die erwähnte ATR-FTIR-Technik sowie Dickenmessung über Ellipsometrie. Aus den experimentellen Daten wurde ein Plaque-Index ermittelt, der die Wirksamkeit der Antiplaquemittel nachwies [177]. Herles et al. [116] setzte ein im Vergleich

zu Gaffar et al. [177] modifiziertes in vitro-Modell mit fünf Bakterienstämmen ein und analysierte die Plaqueakkumulation über die ATR-FTIR-Technik, die Bestimmung des DNA- und Proteingehaltes, der Viabilität über Fluorescein-Diacetat und Ethidiumbromid sowie dem stammspezifischen Nachweis der Bakterien über Selektiv-Agarnährböden. Insofern stellt dieses in vitro-System ein methodisches Pendant zu dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten System dar.

Die in dieser Arbeit verwendete LIF-Detektion wurde dagegen experimentell eingesetzt, um die prinzipielle Anwendbarkeit dieser Technik für die Analyse von Biofilmen zu zeigen. Der Vorteil dieser Methode ist die Detektion autogener intrazellulärer Fluoreszenzsignale von Zellen. Zu den autofluoreszierenden Molekülen gehört u.a. das NADH (die Fluoreszenzintensität von NAD ist um ein Vielfaches geringer bei 337 nm Excitation und 465 nm Emissionsmessung), Flavinderivate sowie Protoporphyrin IX. Da diese Moleküle u.a. eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel und der Energiegewinnung (oxidative Phosphorylierung) spielen, ist die Signalintensität direkt korrelierbar mit der Menge an akkumulierten Bakterien sowie ihrer Stoffwechselaktivität. Das Verfahren wurde bisher erfolgreich u.a. für die Unterscheidung tumorösen von gesundem Gewebe sowie für die Bewertung des Einflusses von Pharmaka auf die Atmungsaktivität von Zellen unter Einkopplung des Laserlichtes und Detektion der Fluoreszenz mittels Lichtleitfasertechnik eingesetzt [250, 251]. In der vorliegenden Ausbaustufe ist das Verfahren jedoch noch zu ungenau, um Differenzen der Akkumulation bzw. der Stoffwechselaktivität von Bakterien orts aufgelöst detektieren zu können. Interessant ist dabei, dass die gefundene großflächige Inhomogenität der Plaquefilme auf den Proben mit Ergebnissen von Wood et al. [66] korreliert. Er beschreibt eine höhere Plaqueakkumulation am Rand einer in situ-Vorrichtung nach 4 Tagen Inkubation unter Mundhöhlenbedingungen verglichen mit dem Zentrum der Vorrichtung. Ähnliche Befunde zur Verteilung der Plaquefilme konnten in der vorliegenden Arbeit regelmäßig auf Titan und Gold detektiert werden. Auch wenn beide Testansätze und Prüfvorrichtungen nicht direkt vergleichbar sind, scheinen Fliessprozesse beim Antransport der Bakterien die Ursache zu sein. Die lokal auftretenden Akkumulationen adhärierter Bakterien im mittleren Bereich auf PTFE-Proben sind damit jedoch nicht zu erklären. Auch die oberflächentopografischen Daten ( $R_a$ ,  $R_{max}$ ) geben hier keine befriedigende Antwort hinsichtlich eventuell vorhandener oberflächentopografischer Fehlstellen auf PTFE. Die Ergebnisse deuten jedoch an, dass bei entsprechender Sondenkonfiguration (u.a. Mikroskop-Optiken) die LIF-Detektion ein hohes Potential für die schnelle und nichtinvasive Analyse von Biofilmbildungsprozesses und der Vitalität von Biofilmen über die Detektion autogener Fluoreszenzsignale besitzt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass viele der in vitro-Plaquesimulationsverfahren zur Modellierung einer möglichst naturnahen Plaque eingesetzt werden. Alternative Chemostat-Modelle sind sehr zahlreich und unterscheiden sich in vielen methodischen und inhaltlichen Teilaspekten. Das hier verwendete Modell soll (und kann) nicht die Bildung einer strukturierten reifen Plaque simulieren. Es ist vielmehr als Prüftool mit hinreichender Relevanz zur klinischen Situation für die Testung des

Effektes von Materialoberflächen auf die initiale Adhäsion einsetzbar. Zu diesen Materialeffekten zählen neben der Oberflächentopografie und -energie ebenso oberflächenmodifizierende Schichten, die eine energetisch bzw. (bio)chemisch induzierte Reduzierung der Plaquebildung bewirken können. Das Gesamtkonzept vereint die Vorteile einer kontrollierbaren kontinuierlichen Chemostat-Kultur mit einem geeigneten Spektrum an Analyseverfahren ohne die wesentlichen Einflussfaktoren der initialen Adhäsion von Mikroorganismen unzulässig einzuschränken. Es stellt in dieser strikten Ausrichtung und konsequenten Umsetzung eine Alternative zu bestehenden Systemen dar.

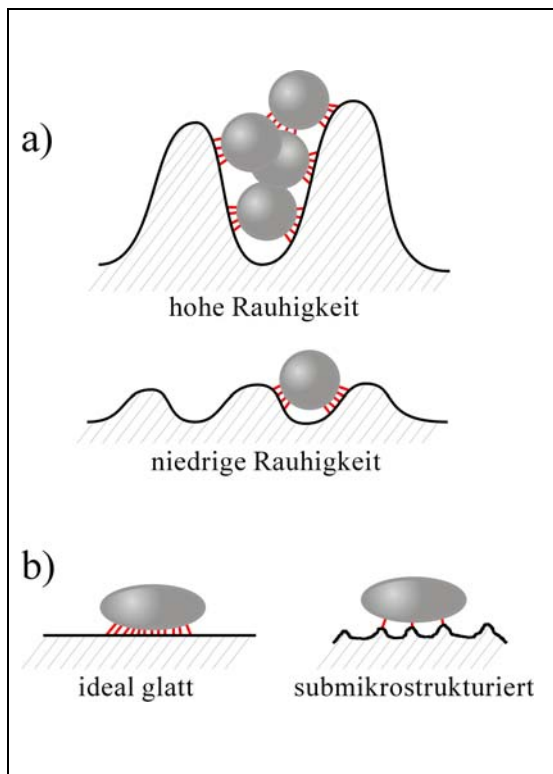
#### **4.3. Einfluss der Oberflächentopografie und Oberflächenenergie**

Hinsichtlich der Anwendung des in vitro-Systems als Prüftool für die Testung der initialen Adhäsion von dentalen Bakterien auf Biomaterialien wurde der Einfluss der materialspezifischen Einflussfaktoren auf die Grenzflächeninteraktionen zwischen Oberfläche und Mikroorganismus bestimmt. Dabei sind die Oberflächentopografie sowie die Oberflächenenergie die bestimmenden Materialparameter. Da sie im Zuge der Materialherstellung und Verarbeitung variable Parameter darstellen, können sie entsprechend den Ergebnissen von Plaqueakkumulationsversuchen zielgerichtet angepasst werden, um durch die Verringerung der Zahl akkumulierender Plaquebakterien während der Phase der initialen Adhäsion die Ausbildung von Plaquebiofilmen zu verzögern, was einen Beitrag zur Erhöhung des therapeutischen Effektes von Restaurationsmaterialien leistet.

Für die Validierung des in vitro-Systems als geeignetes Prüftool für die Testung der initialen Adhäsion und deren Beeinflussung wurden Materialien mit unterschiedlichen Oberflächenenergien sowie Oberflächenrauigkeiten eingesetzt. Der Einfluss der Oberflächenenergie und Oberflächentopografie auf die Plaquebildung wurde durch verschiedene Autoren gezeigt [16, 17, 23, 162, 191, 225, 242, 252, 253]. Von Mierau [253] und Carlen et al. [162] zeigten die Korrelation zwischen hoher Oberflächenrauigkeit und hoher Plaqueadhärenz. Die Topografie ist auch von Rimondini et al. [242] als der dominierende Faktor in der frühen Plaquebildungsphase beschrieben worden. Dagegen beschreibt Tullberg [228] eine Erhöhung der Plaqueadhärenz auf einigen Materialien (Amalgam, PMMA, Gold, Porzellan) trotz verringerter Oberflächenrauigkeit nach Polieren. In vivo-Studien wiesen jedoch nach, dass der Prozess der Plaquebildung von Fehlstellen der Materialoberfläche mitbestimmt wird. Areale mit Löchern, Rissen und Abriebdefekten weisen eine höhere Zahl initial adhärierter Bakterien auf im Vergleich zu glatten Oberflächen, was den induzierenden Effekt topografischer Parameter auf die Plaquebildung mit Ausbildung von Arealen unterschiedlicher Plaquebesiedelung unterstreicht [16]. Nyvad et al. [99] fand jedoch auch, dass topografische Unterschiede keine Veränderung der Spezieszusammensetzung verursachen. Der topografische Effekt ist auf den Transport der Bakterien aus der planktonischen Phase zur mikrostrukturierten Materialoberfläche zurückzuführen. Rauhe Oberflächen verursachen einen Fließwiderstand, der zur

Verringerung von abscherenden Kräften und damit zur Verringerung der bakteriellen Desorption während der initialen Adhäsion führt [4, 24]. Eine hohe Rauigkeit stellt zusätzliche Nischen und eine vergrößerte Oberfläche für eine bakterielle Adhäsion zur Verfügung und verringert den plaqueentfernenden Effekt der Zahnpflege [16, 242]. Gleichfalls fand Yamauchi et al. [254], dass die Adhäsion von Bakterien auf Oberflächen mit unterschiedlichen Rauigkeiten stammspezifisch ist. Dies deutet auf weitere Faktoren hin, die den eher nichtspezifischen topografischen Effekt durch spezifische Interaktionen zwischen Zelloberflächenliganden [4] bzw. chemischen Faktoren [255] und der Materialoberfläche überlagern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten diese Befunde bestätigen. Die Plaqueakkumulation zeigt eine klare Abhängigkeit von der Oberflächenrauigkeit. Rauhe Materialien akkumulieren mehr Plaquebakterien als glatte Oberflächen des gleichen Materials. Dieser Befund ist signifikant für die PTFE-Oberflächenmodifikationen. Dieses Material zeigt eine tendenzielle niedrigere Plaqueakkumulation aufgrund oberflächenenergetischer Effekte (siehe dieses Kapitel). Auf dem niedrigerenergetischen Material Biosil L ist ebenfalls nur eine geringe Plaqueakkumulation detektierbar, wobei jedoch von topografischen Fehlstellen (Lunker), die hier frequentiert auftreten, eine nennenswerte Plaqueakkumulation ausgehen kann. Dies verdeutlicht den Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die initiale Adhäsion, der bei Biosil L stets lokal begrenzt ist. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich strukturelle Änderungen der Materialoberfläche an Fehlstellen auch in Veränderungen der lokal vorliegenden energetischen Verhältnisse niederschlagen, die zur Initiierung von Plaquebildungsprozessen führen können. Für Titan wurde eine deutliche Reduzierung der Plaqueadhärenz unterhalb eines  $R_a$ -Wertes von  $0,088\ \mu\text{m}$  angegeben. Bollen et al. [256] gibt einen kritischen  $R_a$ -Wert für die Rauigkeit von  $0,2\ \mu\text{m}$  an, unter dem keine weitere Reduzierung der Plaquemenge erzielt werden kann. Diesem Befund sollte durch Polierung entsprechender Oberflächen von Restaurationsmaterialien Rechnung getragen werden [256]. Jedoch stellt eine Politur nicht für alle Materialien das ideale Oberflächenbearbeitungsverfahren dar. Carlen et al. [162] verweist auf eine Erhöhung der Oberflächenrauigkeit bei Polyacrylsäure-Kompositen durch die Politur, verbunden mit einer Änderung der chemischen Zusammensetzung an der Oberfläche. Diese Effekte können zur Erhöhung der Plaqueakkumulation führen. Demnach besitzt die Bezeichnung „Politur“ nicht immer die gleiche Bedeutung für alle Materialien. In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Kompositwerkstoff Definite (Methacrylsäure-Basis) entsprechend dem praxisüblichen Verfahren poliert. Die erhöhten  $R_a$ -Werte bestätigen dabei die erwähnten publizierten Befunde. Die trotzdem relativ niedrige Plaqueakkumulation auf dem Komposit-Werkstoff Definite kann daher bei ähnlich niedrigen Rauigkeiten wie der der weiteren Werkstoffe nochmals verringert sein. Allerdings ist für eine derartige Extrapolation zu beachten, dass die  $R_a$ -Werte der Materialien im Bereich von  $0,05$ - $0,1\ \mu\text{m}$  liegen und somit dem Grenzwert entsprechen, unterhalb dessen keine weitere topografisch induzierte Verringerung der Plaqueakkumulation erzielt werden kann. Abbildung 37a zeigt ein Schema, wie sich die Oberflächentopografie aufgrund geometrischer Verhältnisse auf die Bakterienbesiedelung auswirken kann. Der adhäsionsfördernde Effekt höherer Rauigkeiten bei





**Abb. 37:** Einfluss der Topografie auf die Bakterienadhäsion

gleichzeitig wirkenden energetischen Interaktionen mit der Oberfläche wird deutlich. In den vorliegenden Untersuchungen entsprechen die Größenordnungen der Bakterien (insbesondere der kokkoiden Bakterien) denen der Oberflächenrauigkeit, so dass die Ergebnisse zum Einfluss der Topografie zu erwarten waren. Eine weitere Verringerung der Rauigkeit muss jedoch nicht zur weiteren Reduzierung adhärierender Bakterien führen, da energetische Interaktionen durch eine erhöhte Kontaktfläche an Bedeutung gewinnen (Abb. 37b). Oberflächenrauigkeiten im Submikrometerbereich können hingegen die Adhäsionsstärke aufgrund der Verringerung der Kontaktfläche des Bakteriums zur Materialoberfläche nochmals deutlich reduzieren. Gekoppelt mit einer hydrophoben Oberfläche wird dies z.B. beim Lotus-Effekt deutlich.

Der Einfluss der Oberflächenenergie auf die Plaqueadhärenz wird intensiv diskutiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zwischen den hochenergetischen Materialien Titan und Gold und dem niedrigerenergetischen PTFE eine Tendenz zur Plaquereduzierung auf PTFE zu verzeichnen ist (bei jeweils vergleichbarer Rauigkeit). Für die Oberflächen mit niedriger Rauigkeit ist dieser Befund signifikant. Bei diesen Proben ist der Einfluss der Rauigkeit minimiert und die oberflächenenergetischen Einflüsse auf die initiale Plaqueakkumulation gewinnen zunehmend an Bedeutung. Dabei besteht kein Zweifel, dass die zugrundeliegenden Mechanismen wesentlich komplexer sind im Vergleich zum Einfluss der Topografie.

Entsprechend des Ansatzes von Absolom et al. [83, 257] sind für Interaktionen an Oberflächen drei Parameter entscheidend, die sich über die Oberflächenenergie bestimmen lassen: die Oberflächenspannung a) des Bakteriums, b) des Substrates und c) des Mediums (siehe auch Kapitel 1.4.). Ist die Oberflächenspannung des Mediums höher, als die des Bakteriums, so sinkt die Freie Adhäsionsenergie mit steigender Oberflächenspannung der Materialoberfläche und umgekehrt. Da die Mehrzahl der oralen Bakterien, insbesondere der initialen Streptokokken eine hohe Oberflächenenergie aufweisen [258] und der Speichel eine relativ niedrige Oberflächenenergie besitzt [259], ist entsprechend dem Modell die Adhäsion von Bakterien an Dentalwerkstoffen mit hohen Oberflächenenergien erhöht. Busscher et al. [185] und Quirynen et al. [16] zeigten, dass die Plaquebildung auf hydrophoben (niedrigerenergetischen) Materialien reduziert ist. Stammspezifische Unterschiede der Adhäsion auf Materialien mit unterschiedlichen Oberflächenenergien konnten auf

bakterienspezifische Oberflächenparameter zurückgeführt werden und korrelierten mit dem von Absolom angeführten Ansatz [126, 187, 260]. Weerkamp et al. [191] fand, dass niedrigenergetische Oberflächen mehr Bakterien mit niedriger Oberflächenenergie akkumulieren und die Adhäsion von Bakterien mit hochenergetischen Oberflächen auf hochenergetischen Oberflächen bevorzugt stattfindet. Die stattfindenden Interaktionen können dabei durch stammspezifische Effekte wie der Produktion von oberflächenaktiven Substanzen modifiziert werden [45]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe Komplexität der Interaktionen zwischen den beteiligten drei Reaktionsphasen und die Schwierigkeiten einer allgemeinen Einschätzung der Effekte von Materialoberflächenparametern auf die initiale Bakterienadhäsion. Die Verhältnisse an der Bakterien-Material-Grenzfläche werden zusätzlich durch die Adsorption der Speichelkomponenten bzw. der Analoga von in vitro-Modellen beeinflusst. Die Adsorption der Protein- und Glycoproteinkomponenten führt zur Reduzierung bestehender Unterschiede der Oberflächenenergien von Materialien, so dass materialspezifische Unterschiede in der Oberflächenenergie nivelliert werden können [261] und energetisch beeinflusste nichtspezifische Effekte auf die initiale Adhäsion weniger durch das Material, sondern durch die adsorbierende Pellikelschicht und spezifische Interaktionen bestimmt werden [4, 192, 262-264]. Diese wiederum kann je nach Oberflächenenergie des Ausgangsmaterials deutlich voneinander abweichende Zusammensetzungen und Konformationen besitzen. So sind unterschiedliche Aminosäurezusammensetzungen in adsorbierenden Pellikelschichten auf Glas, Epoxy-Materialien und Zahnschmelz gefunden worden, was auf hochenergetischen Materialien wiederum zu einer hohen Plaqueadhärenz führte [98, 192]. In in vivo-Experimenten zeigte sich, dass die Plaquemenge auf Materialien mit spezifischen Oberflächenenergien von  $35 \text{ erg/cm}^2$  ein Minimum, auf Materialien mit ca.  $50 \text{ erg/cm}^2$  ein Maximum aufweist. Materialien mit höheren bzw. niedrigeren Oberflächenenergien wiesen mittlere Plaquemengen unabhängig von der Oberflächenenergie der Materialoberfläche auf [192]. Das lässt den Schluss zu, dass bakterielle Mischpopulationen (mit Bakterienspezies, die sich in ihren Oberflächeneigenschaften unterscheiden können) auf pellikelbedeckten Dentaloberflächen während der Inkubation einem mengenmäßigen Gleichgewichtszustand zustreben, der zunehmend unabhängig von dem Substratmaterial wird und der nur bei bestimmten oberflächenenergetischen Charakteristika zu deutlichen Verschiebungen der Plaquemenge führt. Jedoch werden die oberflächenenergetischen Ausgangsparameter der Materialien auch durch die adsorbierende Oberflächenschicht nicht vollständig unterdrückt [23]. Van Dijk et al. [192] fand, dass die Adhärenz von Mikroorganismen auf pellikelbeschichteten Substraten von der Oberflächenenergie des Ausgangsmaterials beeinflusst wird. Trotz der hohen Komplexität der energetischen Interaktionspartner erlaubt daher eine integrale Betrachtung des Effektes aller an der Plaqueakkumulation beteiligten Partner, einschließlich der modulierenden Wirkung adsorbierender Proteinschichten auf Substraten und Bakterienoberflächen, die Beurteilung des oberflächenenergetischen Effektes auf die Plaqueakkumulation, ohne sich in Teilaspekten zu verlieren. Dies ist insbesondere für ein gewünschtes Feedback zur Variation

oberflächenenergetischer Parameter von Dentalwerkstoffen zur Minimierung der Plaqueakkumulation notwendig.

Der integrale Effekt der Oberflächenenergie der untersuchten Biomaterialien unter Einhaltung methodischer Randbedingungen wie der Adsorption von Speichelproteinen auf den Oberflächen sowie definierten Bakterienstämmen führt zur verstärkten Plaqueakkumulation auf Titan und Gold im Vergleich zu PTFE, wenn auch die Unterschiede aufgrund der Nivellierung der energetischen Unterschiede der Oberflächen durch die Adsorption von BSA gering sind. Für Titan wird dabei von verschiedenen Autoren eine Tendenz zur hohen Plaqueakkumulation beschrieben [16, 264-266]. Die Ursache hierfür wird mit der sich spontan ausbildenden passivierenden Titanoxid-Schicht begründet. Sauerstoffdefekte in Arealen der spontanen Passivierungsschicht können zur Chemisorption von Anionen beitragen, die wiederum die Adhäsion dentaler Bakterien fördern. Krämer et al. [265] zeigte, dass die anodische Oxidation von Titan (Kompensierung von Sauerstoffdefekten) zur Reduzierung der Plaqueakkumulation führt. Die relativ hohe Plaqueakkumulation von Gold im Vergleich mit Titan kann daher in einer Passivierungsschicht ohne ausgedehnte Sauerstofffehlstellen begründet sein. Der Einfluss einer niedrigen Oberflächenenergie der Ausgangsmaterialien auf die Plaqueakkumulation zeigt sich auch auf den praxisrelevanten Dentalwerkstoffen. Biosil L weist hier die geringste Oberflächenenergie auf. Trotz Angleichung der energetischen Unterschiede durch die adsorbierende Proteinschicht sind auf diesem Material die mit Abstand geringsten Plaquemengen detektierbar. Bei diesem Material kann jedoch auch der antimikrobielle Effekt freigesetzter Cobaltionen eine Rolle spielen, der von verschiedenen Autoren beschrieben wurde [244, 267]. Dem gegenüber steht der Befund, dass das Lebend-/Tot-Verhältnis der akkumulierten Bakterien auch auf Biosil L keine Unterschiede zu den weiteren Materialien zeigte. Eine interessante Alternative zur Erklärung dieses Befundes sowie zur allgemeinen Beschreibung der Interaktionen an der Grenzfläche zwischen Bakterium und Materialoberfläche ist die Einbeziehung von DLVO-Kräften und non-DLVO-Kräften für alle beteiligten interagierenden Phasen. Insbesondere die separate Wertung dispersiver und polarer Komponenten der Oberflächenenergie und die damit in Zusammenhang stehende Hydrophobizität kann unter Umständen eine alternative Interpretation der Plaqueakkumulation auf Materialien mit unterschiedlichen Oberflächenenergien erlauben. Die bei rein dispersiven Oberflächen wirkenden London-Kräfte als Komponente der DLVO-Kräfte werden auf polaren Oberflächen durch eine ganze Anzahl an non-DLVO-Kräften ergänzt, zu denen insbesondere Wechselwirkungen zwischen Hydrathüllen von Bakterien wie auch der hydratisierten Materialoberfläche gehören und die durch hydrophile bzw. hydrophobe Energieinteraktionen bestimmt werden. Inwieweit dabei derartige Interaktionen den Debye- und Keesom-Kräften (als DLVO-Kräfte) zuzuordnen sind, ist derzeit noch Gegenstand laufender Forschungsarbeiten. Für die Hydratisierung der Oberflächen der interagierenden Partner spielt dabei ihre Hydrophobizität, die bei Bakterien u.a. von Zellwandstrukturen beeinflusst wird, eine große Rolle. Im Prinzip weist die Mehrzahl dentaler Bakterien Oberflächen mit polaren Anteilen auf. Die dabei auftretenden induzierten bzw. permanenten Dipole interagieren über Debye-

und Keesom-Kräfte mit polaren Anteilen der Oberfläche. Oberflächen mit erhöhtem dispersiven Anteil sind dagegen nicht „attraktiv“ genug und folglich werden adhäsive Wechselwirkungen erschwert. Hydrophobe Bakterienstämme adhäreren durch abstoßende Kräfte der wässrigen Phase. Man nimmt an, dass die hydrophoben Bindungen zur Stabilisierung von ionischen, Ion-Dipol- und Wasserstoffbindungen beitragen [268]. Das Auftreten von Fimbrien, die längere Distanzen überbrücken können und stabilisierend wirken, ist oft mit der Hydrophobizität korreliert [22]. Boulange-Petermann et al. [269] beschreibt die Korrelation der Adhäsion von *S. thermophilus* auf Stahloberflächen mit der Polarität. Kitano et al. [270] konnte zeigen, dass die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an Biomaterialien von der Polarität bestimmt wird. Ähnliche Phänomene wurden von Schakenraad et al. [186] und Van der Valk et al. [271] für die Proliferation und das Spreiten humaner Zellen in Kontakt mit verschiedenen Polymeren und Glas sowie von Bacakova et al. [272] für die Zelladhärenz auf Polystyrol beschrieben. Glantz [273] fand einen sprunghaften Anstieg der Plaqueakkumulation in Abhängigkeit der Oberflächenenergie und Polarität. Demnach führt eine Erhöhung der Oberflächenenergie oberhalb eines gegebenen Schwellenwertes nicht zur Steigerung der Plaqueakkumulation. Als Konsequenz wird geschlussfolgert, dass Materialien mit differierenden Oberflächenenergien nicht konsequenterweise zu einer unterschiedlichen Plaqueakkumulation tendieren.

In der vorliegenden Arbeit weisen die Ausgangsmaterialien deutlich unterschiedliche polare Anteile der Oberflächenenergie auf. Wenngleich sich die polaren Anteile während der Inkubation infolge der Proteinadsorption deutlich verschieben können, zeichnet sich die Tendenz ab, dass Materialien mit einem hohen polaren Anteil mehr Plaque akkumulieren, als Materialien mit einer geringen Polarität. Dies wird insbesondere bei dem Vergleich von Degunorm (hohe Polarität im Ausgangszustand) mit der wenig besiedelten Legierung Biosil L (niedrige Polarität im Ausgangszustand) deutlich. Da die Proteinadsorption wie nachgewiesen einer zeitlichen Kinetik folgt, wird postuliert, dass die Polarität der Ausgangsmaterialien für die frühen Adhäsionsprozesse von Plaquebakterien bei niedriger Rauigkeit eine bedeutende Rolle bei der Etablierung von Erstbesiedlern auf der Oberfläche spielt, mit zunehmender Inkubationszeit jedoch weitere Einflussfaktoren an Bedeutung gewinnen.

Die in der DLVO-Theorie berücksichtigten elektrostatischen Kräfte der Oberflächen, deren nominaler Wert durch das Zeta-Potential der Oberflächen ausgedrückt wird, haben für die detektierten Unterschiede der Plaqueakkumulation dagegen keine Bedeutung. Zeta-Potential-Messungen an den Materialoberflächen zeigten, dass die Unterschiede der elektrostatischen Ladungen im neutralen Bereich vernachlässigt werden können. Die anhand der Ionenkonzentrationen des komplexen Medium sowie der Leitfähigkeit des Mediums kalkulierte Ionenstärke liegt dabei über dem kritischen Wert von 0,1 mol/l [274], was zum Zusammenbruch der elektrischen Doppelschicht an den Oberflächen führt und die Bakterien direkt mit den Oberflächen ohne elektrostatische Wechselwirkungen interagieren lässt. Auch von Busscher et al. [117] wird eine von der Oberflächenladung unabhängige

Plaqueakkumulation (auf Glas-Oberflächen) unter Verwendung von Medien mit hoher Ionenstärke beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Materialien unterschiedliche Plaqueakkumulationen während der initialen Adhäsion zeigen. Oberflächentopografien mit  $R_a$ -Werten  $>0,1 \mu\text{m}$ , was oberhalb praxisüblicher polierter Materialoberflächen liegt, tragen entscheidend zur Plaqueakkumulation bei und stellen den dominierenden Faktor der initialen Adhäsion dar. Auf Oberflächen mit  $R_a$ -Werten  $\leq 0,1 \mu\text{m}$  wird der Einfluss energetischer Parameter deutlich. Eine geschlossene Bewertung der Plaqueakkumulation bezüglich der oberflächenenergetischen Parameter ist aufgrund einer noch fehlenden umfassenden Modellierung der beteiligten thermodynamischen Komponenten jedoch nur unvollständig möglich. So sind auf keramischen Werkstoffen trotz einer hohen Oberflächenenergie vergleichsweise niedrige Plaqueakkumulationen nachgewiesen worden [197, 198, 244]. Es war nicht das Ziel dieser Arbeit, anhand einer gezielten Variation der physikochemischen Parameter aller am Adhäsionsprozess beteiligter Partner (Medium, Substrat, Bakterium) eine entsprechende Modellierung zu entwickeln. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass anhand einer derartigen Studie momentan nicht zu beantwortende Fragestellungen bearbeitet und gelöst werden können. In diesem Kontext gelten die physikochemischen Interpretationen der Ergebnisse streng genommen nur für die hier gewählten experimentellen Randbedingungen. Würde es in Zukunft gelingen, in vitro-Modelle für die Plaqueadhärenzprüfung zu entwickeln, die diesen theoretischen Ansprüchen entsprechen, würde eine neue Generation von in vitro-Testungen möglich sein. Die vorliegenden Befunde sprechen deutlich für die Richtigkeit einer derartigen Vorgehensweise.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung zum Einfluss der Oberflächentopografie und Oberflächenenergie sind nicht neu. Sie zeigen jedoch, dass die mit dem vorliegenden in vitro-System erzielten Daten zur Plaqueadhärenz mit publizierten Ergebnissen korrelieren und damit die Relevanz des gewählten Testdesigns untermauern. Die in vitro-Prüfung zeigt Unterschiede der Plaqueakkumulation, die sich der kritischen in vivo-Prüfung stellen müssen.

#### **4.4. In vivo-Relevanz**

Von Scheie [22] wurde die in vitro-Simulation der Plaqueakkumulation sehr kritisch bewertet, da die Situation in der Mundhöhle eine enorme Komplexität aufweist und es extrem schwierig ist, alle involvierten Parameter in einem künstlichen System zu berücksichtigen. Demnach zählen dazu auch die Faktoren, die die frühe Plaquebildungsphase beeinflussen. Gleichfalls wurde betont, dass in vitro-Systeme bedeutende Aspekte zum Verständnis der nichtspezifischen und spezifischen Interaktionen während der Initialphase beitragen können, wenn separate Teilaspekte der Plaquebildung das Ziel der Untersuchungen darstellen. Für die meisten investigativen in vitro-Modelle wird daher auch nicht der

Anspruch erhoben, die Plaquebildung unter oralen Mundhöhlenbedingungen nachbilden zu können. Vielmehr werden auf der Basis bekannter Daten zu physikochemischen und mikrobiologischen Parametern der Mundhöhle und der Plaquemikroflora Modellbedingungen kreiert, die so weit wie möglich praxisnah und gleichzeitig beherrschbar und interpretierbar sind. Das Verhältnis von Anspruch und methodischem Kompromiss entscheidet dabei über die Qualität der Ergebnisse und ihrer in vivo-Relevanz. Ein zu hoher Anspruch investigativer Modelle an das zu simulierende Ziel muss an den methodischen (und technischen) Schwierigkeiten der Simulation scheitern. Gleichfalls sinkt durch eine zu hohe Reduzierung notwendiger Randbedingungen eines in vitro-Modells die in vivo-Relevanz. Die Ergebnisse von in vitro-Modellen müssen daher an der klinischen Situation gemessen und durch in vivo-Studien validiert werden. Hierbei besteht jedoch ein weiteres Problem, da es selbst für in vivo-Studien kein allgemeingültiges Konzept gibt. Die hohe Varianz einer Fülle von Parametern führt dazu, dass die Ergebnisse nur schwer oder teilweise gar nicht vergleichbar sind. An dieser Stelle soll und kann auch nicht auf eine vergleichende Bewertung der Vielzahl an in vivo-Studien zur Plaqueakkumulation eingegangen werden, da sie sich erheblich durch das Ziel der Untersuchung, der Art der gewählten Substratmaterialien, ihrer Oberflächenbehandlung, der Inkubationszeit, der Applikation in der Mundhöhle, der Auflagen an die Probanden und der Analyseverfahren unterscheiden [6, 16, 25, 64, 66, 72, 99, 105, 148, 170, 173, 179, 188, 191-193, 196, 214, 223, 224, 226, 227, 238, 240-244, 246-248, 255, 256, 263, 275-296]. Trotz methodischer Unterschiede können jedoch tendentielle Vergleiche zur Plaqueakkumulation angestellt werden, wenn sich die in vivo-Untersuchungen auf den Einfluss des Materials beschränken. So ist der dominierende Einfluss der Oberflächentopografie auf die frühe Plaqueadhärenz klinisch validiert [16, 100, 168, 244, 256]. Ebenso wurden Unterschiede der Plaquebesiedelung auf verschiedenen Materialien mit deren Oberflächenenergie korreliert. In der Regel zeigen hochenergetische Materialoberflächen unter klinischen Bedingungen eine gesteigerte Plaquebildung [16]. Insbesondere die Plaquebildung auf hochenergetischen Keramiken und einigen Gold-Komposit-Materialien wird jedoch sehr kontrovers diskutiert. Es wurden plaquereduzierende Effekte gezeigt [198, 216, 225, 297], wie auch Plaqueakkumulationen vergleichbar mit Titan [241]. Ein Konsens besteht bei dem nivellierenden Einfluss oberflächenenergetischer Materialunterschiede durch die adsorbierende Pellikelschicht sowie dem Befund, dass die frühe Plaquebildung einschließlich der Adsorption von Speichelkomponenten durch Materialparameter beeinflusst wird, die Plaquereifung jedoch von mikrobiologischen Interaktionen bestimmt wird [193].

Für einen Vergleich von in vitro- mit in vivo-Ergebnissen ist es unbedingt notwendig, wesentliche Testbedingungen wie die Materialauswahl, Inkubationszeiten und die angewendeten Analyseverfahren zu standardisieren. Dies gilt insbesondere für eine Studie zur in vivo-Validierung eines in vitro-Modells. So konnte Olsson [298] zeigen, dass vergleichende in vitro-/in vivo-Studien bei Anwendung standardisierter Testverfahren übereinstimmende Ergebnisse erzielen können.

Zur Validierung der vorliegenden in vitro-Ergebnisse wurde im Unterauftrag unseres Institutes durch das ZMK der Universität Göttingen eine in vivo-Studie durchgeführt. Dabei wurden die experimentellen Randbedingungen in enger Zusammenarbeit mit der Göttinger Arbeitsgruppe festgelegt, um eine möglichst hohe methodische Vergleichbarkeit zu erzielen. Weiterhin wurden sämtliche analytische Aufarbeitungen der in vivo-Proben durch unser Institut entsprechend dem Analysenspektrum der in vitro-Proben durchgeführt. Die methodischen Randbedingungen sowie die in vivo-Ergebnisse sind bei Wehle [188] in einer zu dieser Dissertation komplementären Arbeit aufgeführt. Folgende in vivo-Prüfbedingungen wurden definiert (vergl. auch 3.3.):

- Materialien: Titan, Degunorm, Definite, Duceragold, Biosil L mit der gleichen Oberflächenbehandlung wie die Materialien in den in vitro-Versuchen
- Einsatz von je 8 Materialien in eine Oberkieferschiene (4 Materialien pro Seite, buccal)
- 9 Probanden (Nichtraucher, ohne ersichtliche pathologische Zahnauffälligkeiten)
- Tragedauer: 16 h
- strikte Auflagen an die Probanden bezüglich der Nahrungsaufnahme und Zahnpflege
- Ablösung und Aufarbeitung der Bakterienpopulationen entsprechend der Testmethodik der vorliegenden Arbeit
- Analyseverfahren: REM, FTIR, quantitative Bestimmung der Gesamtzahl adhärierter Bakterien

Die quantitative Bestimmung der Gesamtzahl der Bakterien wurde mittels Agarkultivierung der abgelösten und vereinzelter Bakteriensuspensionen durchgeführt. Diese Abweichung von dem in vitro-Prüfdesign war notwendig, da nur ein Teil der Bakterienspezies auf den in vivo-Materialien mit Hilfe des LIVE/DEAD® BacLight™- Kits fluoreszenzmarkiert werden konnten, was in einer modifizierten Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe durch verschiedene Wildstämme oraler Bakterien begründet ist. Das Ziel der Studie bestand im Vergleich des Plaqueakkumulationspotentials unterschiedlicher Materialien unter in vivo-Mundhöhlenbedingungen mit den Ergebnissen der in vitro-Untersuchungen.

Als wesentliches Ergebnis wurde ein nahezu übereinstimmendes Ranking der Materialien bezüglich der Plaqueadhärenz gefunden (Angaben in Bakterien/cm<sup>2</sup>):

Degunorm ( $3,01 \times 10^6$ ) > Titan ( $2,96 \times 10^6$ ) > Definite ( $2,80 \times 10^6$ ) > Duceragold ( $2,46 \times 10^6$ ) > Biosil L ( $1,32 \times 10^6$ )

Die quantitativen Daten konnten ebenso durch REM- und FTIR-Analysen bestätigt werden. Die Daten zeigten jedoch auch eine bedeutend höhere Varianz im Vergleich zu den in vitro-Untersuchungen, was einen wesentlicher Nachteil von in vivo-Prüfungen darstellt. Dabei treten nicht nur interindividuelle

Unterschiede, sondern auch intraindividuelle Abweichungen auf. In der Studie von Wehle war die Plaquebildung auf den Proben des gleichen Materials sehr unterschiedlich, zeigte jedoch keine Abhängigkeit bezogen auf die Probenposition in der Mundhöhle. Ausgehend von den Daten konnte nur eine sehr schwache Tendenz zu einer verringerten Plaqueakkumulation im Bereich der vorderen Zahnfront verzeichnet werden. Kieferbewegungen, Abrieb an der Wangenschleimhaut und örtlich variabler Speichelfluss können nur einige der Ursachen darstellen. Interessant war, dass die Gesamtzahl nachgewiesener akkumulierter Bakterien stets geringer war, als in den vergleichenden in vitro-Tests. Dies kann in der Methodik der quantitativen Bestimmung begründet sein, da die konventionelle Methodik zur Bestimmung von Bakterien über Agarnährböden die Zahl koloniebildender Einheiten nachweist, jedoch den Anteil an toten Bakterien vernachlässigen muss. Desweiteren ist eine vollständige Kultivierung bakterieller Wildstämme aufgrund der sehr unterschiedlichen Ansprüche an die Kultivierungsparameter nur mit einem sehr großen Aufwand möglich. Nicht zuletzt liegen trotz gemeinsamer Randbedingungen der vergleichenden Studie unterschiedliche biologische „Kultivierungssysteme“ vor, was sich u.a. in der Menge der in der frühen Plaquebildungsphase adhärierenden Bakterien niederschlagen kann und den Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Menge der Plaquebildung unterstreicht [22].

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass das Ranking der Materialien bezüglich der Plaqueadhärenz anhand von in vitro-Ergebnisse durch die in vivo-Studie bestätigt werden konnte. Das in vitro-Modell weist aber aufgrund der definiert einstellbaren Testbedingungen eine höhere Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit der Prüfung auf und damit auch eine geringere Varianz der Ergebnisse. Auch wenn die nominalen Zahlenwerte aufgrund methodischer Differenzen der quantitativen Bestimmung sowie komplexer Interaktionen der dentalen Mikroflora unterschiedlich sind, kann die in vitro-Prüfung ohne Einbuße an klinischer Relevanz für vergleichende Screening-Prüfungen der initialen Plaqueadhärenz an neuen Materialien bzw. Oberflächenmodifikationen eingesetzt werden. Bei nachgewiesener Bioverträglichkeit neuer Dentalwerkstoffe entsprechend den einschlägigen Prüfnormen sollte sich jedoch eine klinische Prüfung anschließen.

#### **4.5. Applikationen und Ausblick**

Das in vitro-Prüfsystem ist aufgrund der Variabilität der Teilkomponenten und Testparameter multivalent einsetzbar. Im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten wurde es erfolgreich für verschiedene Applikationen eingesetzt, von denen im Folgenden einige vorgestellt werden sollen.

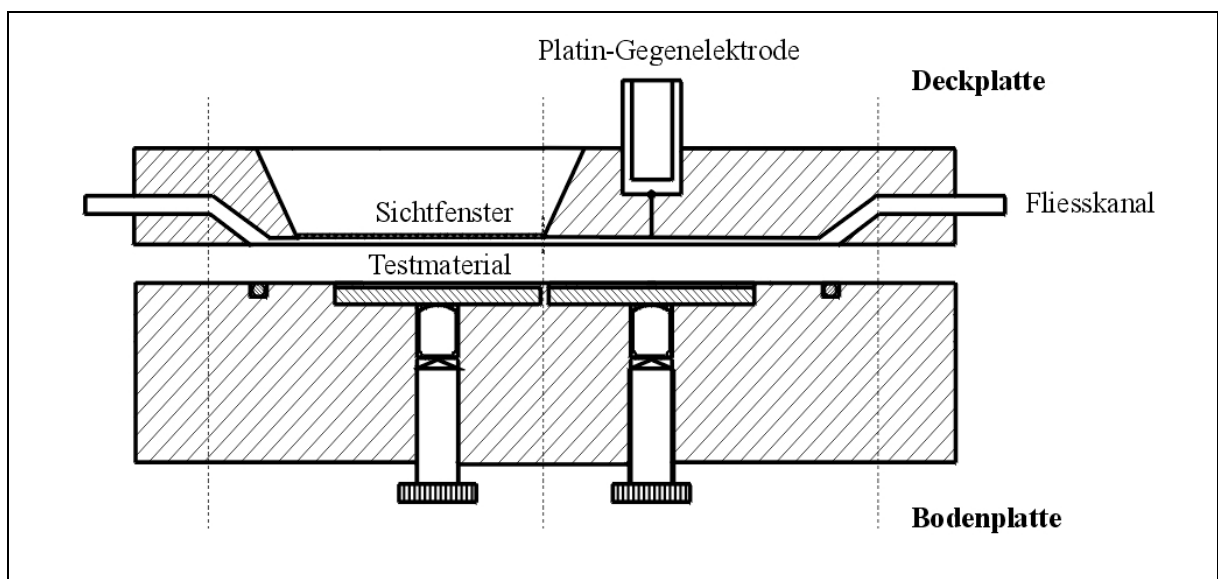
Neben der Prüfung initialer Plaquebildungsprozesse im Sinne einer biologischen Materialprüfung wurden antiadhäsive Oberflächenbeschichtungen geprüft, die für medizinische Gerätschaften (z.B. optische Sensoren) sowie technische Anwendungen in der Wasserwirtschaft entwickelt wurden.



Hierbei kamen unter Modifizierung der mikrobiologischen Kultivierungsbedingungen weitere medizinische (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) und ökologische Keime (*Aeromonas spec*, *Sphingomonas spec*, *Bacillus spec.*) zum Einsatz, um die antiadhäsiven Effekte von Phosphorylcholin [299] sowie Tetraetherlipiden aus Archaea zu validieren. Insofern ist das System für die Erforschung allgemeiner Biofilmprobleme geeignet, da die Mechanismen der initialen Adhäsion bei der Plaquebildung und ihre Beeinflussung durch Oberflächenparameter prinzipiell auf alle Biofilme übertragen werden können. In diesem Kontext konnte u.a. auch die Adhärenz von *Pseudomonas putida* an hydrophilen und hydrophoben Oberflächenbeschichtungen von Substratmaterialien für die Bioremediation unter Einbeziehung der online-Mikroskopie und Bildanalyse nachgewiesen werden.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Plaquebiofilme generiert werden können, die typische Merkmale früher Dentalplaques aufweisen. Aufgrund der relativ hohen Diversität mikrobiologischer Testbedingungen (fünf Bakterienstämme) und der Standardisierung von Testbedingungen auf biotechnologischer Basis (Chemostat) erscheint es daher legitim, für investigative Anwendungen Biofilme unter Berücksichtigung der limitierenden Faktoren des Systems zu generieren, um antibakterielle Effekte von Agenzien zu testen. So wurden Untersuchungen zum antibakteriellen Effekte von Photosensitizern anhand dentaler Biofilme auf Hydroxylapatit durchgeführt. Von Wood et al. [300] wurden dafür u.a. differenzierende Fluoreszenztechniken (Vitalfärbung, CLSM) zur Detektion der Vitalität von Plaquefilmen auf Zahnschmelz nach photodynamischer Therapie (PDT) eingesetzt.

Eine Modifizierung der Fliesskammern ermöglicht die Prüfung korrosiver Effekte auf die Plaqueadhärenz bzw. des Einflusses adhätierender Plaquebiofilme auf die Materialdegradation.



**Abb. 38:** Fliesskammer mit integrierter optischer und korrosionschemischer online-Analyse

Bei metallischen Materialien kann dabei eine bereits entwickelte Fliesskammer eingesetzt werden, die a) die online-Analyse korrosiver Prozesse an der Oberfläche erlaubt sowie b) aufgezwungene korrosive Prozesse (potentiostatische Polarisation) zur Untersuchung des Effektes korrodierender Materialoberflächen auf die Biofilmbildung induziert (Abb. 38).

Die Integration der optischen Fenster gestattet die mikroskopische online-Analyse und Bildanalyse, wobei für die Analyse von Adhäsions- und Plaquebildungsprozessen neben der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie auch die CLSM bzw. nichtlineare Laserrasterverfahren (Multiphotonen-Mikroskopie) möglich sind und kurz vor der Realisierung stehen. Eigene Untersuchungen zur Detektion von Zellen zeigen, dass die Multiphotonen-Mikroskopie die Detektion autogener Zellfluoreszenzsignale gestattet. Neben dem Vorteil der höheren Eindringtiefe in Biofilme aufgrund des Zweiphotoneneffektes kann somit auch die Untersuchung nicht fluoreszenzmarkierter Biofilmkomponenten möglich werden. Neben der quantitativen Erfassung adhätierender Mikroorganismen an nichtdurchstrahlbaren Oberflächen stehen Untersuchungen zur Strukturbildung in wachsenden Biofilmen (einschließlich der Effekte des Quorum sensing) sowie deren Beeinflussung durch Oberflächenparameter im Fokus künftiger Arbeiten.

Untersuchungen zum Verständnis pathologischer Prozesse, der mikrobiologischen Diversität sowie der metabolischen und genetischen Kommunikation sollten den replikativen Modellen der Plaquesimulation vorbehalten bleiben. Das in vitro-Prüfsystem stellt jedoch die Grundlage für eine klinisch relevante Screening-Prüfung der Plaqueadhärenz auf Dentalwerkstoffen dar. Auf dieser Basis kann und sollte eine Weiterentwicklung erfolgen, um das Verständnis materialinduzierter Biofilmprozesse zu erhöhen und eine gezielte Modifikation der Interaktionen auf der Basis validierter in vitro-Testungen einschließlich der Nutzung neuer nichtinvasiver online-Messverfahren zu ermöglichen.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] **Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TJ, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie T.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 1987, 41, 435-464.
- [2] **Koch C.** Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Pediatric Pulmonology* 2002, 34, 3: 232-236.
- [3] **Marsh PD, Bradshaw DJ.** Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology* 1995, 15, 3: 169-175.
- [4] **Rosan B, Lamont RJ.** Dental plaque formation. *Microbes and Infection* 2000, 2, 13: 1599-1607.
- [5] **Marsh PD.** Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dental Clinics of North America* 1999, 43, 4: 599-614.
- [6] **Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J.** Bacterial colonization during de novo plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology* 2003, 30, 11: 990-995.
- [7] **Ritz HL.** Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Archives of Oral Biology* 1967, 12, 12: 1561-1568.
- [8] **Theilade E, Fejerskov O, Prachyabrued W, Kilian M.** Microbiologic study on developing plaque in human fissures. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1974, 82, 6: 420-427.
- [9] **Bowden GH, Hardie JM, Slack GL.** Microbial variations in approximal dental plaque. *Caries Research* 1975, 9, 4: 253-277.
- [10] **Marsh PD, Featherstone A, McKee AS, Hallsworth AS, Robinson C, Weatherell JA, Newman HN, Pitter AF.** A microbiological study of early caries of approximal surfaces in schoolchildren. *Journal of Dental Research* 1989, 68, 7: 1151-4.
- [11] **Hardie JM, Bowden GH.** Bacterial flora of dental plaque. *British Medical Bulletin* 1975, 31, 2: 131-136.
- [12] **Simmonds RS, Tompkins GR, George RJ.** Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: A review of recent advances. *New Zealand Dental Journal* 2000, 96, 424: 44-49.
- [13] **Marsh PD.** Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research* 1994, 8, 2: 263-271.
- [14] **Wirz J, Schmidli F.** Metal incompatibility. *Die Quintessenz* 1987, 38, 3: 573-578.
- [15] **Rincic N, Baucic I, Miko S, Papic M, Prohic E.** Corrosion behaviour of the Co-Cr-Mo dental alloy in solutions of different composition and different pH values. *Collegium Antropologicum* 2003, 27 Suppl 2, 99-106.
- [16] **Quirynen M, Bollen CM.** The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *Journal of Clinical Periodontology* 1995, 22, 1: 1-14.
- [17] **Busscher HJ, Van der Mei HC.** Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 1997, 11, 1: 24-32.
- [18] **Kolenbrander PE.** Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000, 54, 413-437.
- [19] **Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ.** Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *Journal of Bacteriology* 2000, 182, 24: 7067-7069.
- [20] **Frias J, Olle E, Alsina M.** Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. *Infection and Immunity* 2001, 69, 5: 3431-3434.
- [21] **Al-Hashimi I, Levine MJ.** Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Archives of Oral Biology* 1989, 34, 4: 289-295.
- [22] **Scheie AA.** Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 1994, 8, 2: 246-253.
- [23] **Busscher HJ, Cowan MM, Van der Mei HC.** On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiology Reviews* 1992, 8, 3-4: 199-209.

- 
- [24] **Busscher HJ, Bos R, Van der Mei HC.** Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters* 1995, 128, 3: 229-234.
- [25] **Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brecx M.** A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Archives of Oral Biology* 1998, 43, 4: 277-285.
- [26] **Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R.** Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *Journal of Periodontology* 1975, 46, 1: 10-26.
- [27] **Listgarten MA.** Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *Journal of Periodontology* 1976, 47, 1: 1-18.
- [28] **Gibbons RJ, Moreno EC, Spinell DM.** Model delineating the effects of a salivary pellicle on the adsorption of *Streptococcus miteor* onto hydroxyapatite. *Infection and Immunity* 1976, 14, 4: 1109-1112.
- [29] **Gibbons RJ, Moreno EC, Etherden I.** Concentration-dependent multiple binding sites on saliva-treated hydroxyapatite for *Streptococcus sanguis*. *Infection and Immunity* 1983, 39, 1: 280-289.
- [30] **Gibbons RJ, Hay DI, Childs WC, Davis G.** Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Archives of Oral Biology* 1990, 35 Suppl, 107S-114S.
- [31] **Gibbons RJ.** Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *Journal of Dental Research* 1989, 68, 5: 750-760.
- [32] **Brecx M, Theilade J, Attstrom R.** Influence of optimal and excluded oral hygiene on early formation of dental plaque on plastic films. A quantitative and descriptive light and electron microscopic study. *Journal of Clinical Periodontology* 1980, 7, 5: 361-373.
- [33] **Kolenbrander PE.** Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annual Review of Microbiology* 1988, 42, 627-656.
- [34] **Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ.** Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. *J Dent Res* 1996, 75, 2: 809-815.
- [35] **Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C, Schilling KM.** Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral biofilms. *Microbiology* 1996, 142, 3: 623-629.
- [36] **Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C.** Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and Immunity* 1998, 66, 10: 4729-4732.
- [37] **Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C.** Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. *Lett Appl Microbiol* 1997, 25, 385-387.
- [38] **George KS, Falkler WA.** Coaggregation studies of the *Eubacterium* species. *Oral Microbiology and Immunology* 1992, 7, 5: 285-290.
- [39] **Rosan B, Correia F, JM D.** Corncobs: a model for oral microbial biofilms. In: Busscher HJ, Evans LJ (eds.), *Oral Biofilms and Plaque Control*. Harwood, Amsterdam, 145-162, 1998.
- [40] **Byers HL, Tarelli E, Homer KA, Hambley H, Beighton D.** Growth of Viridans streptococci on human serum alpha1-acid glycoprotein. *Journal of Dental Research* 1999, 78, 7: 1370-1380.
- [41] **Kolenbrander PE, Andersen RN, Baker RA, Jenkinson HF.** The adhesion-associated sca operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn<sup>2+</sup> uptake. *Journal of Bacteriology* 1998, 180, 2: 290-295.
- [42] **Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Stepfen MJ, Holt SC.** Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infection and Immunity* 1996, 64, 6: 2094-2100.
- [43] **Barnard JP, Stinson MW.** Influence of environmental conditions on hydrogen peroxide formation by *Streptococcus gordonii*. *Infection and Immunity* 1999, 67, 12: 6558-6564.
- [44] **Rosenberg E.** Microbial surfactants. *CRC Crit Rev Biotechnol* 1986, 3, 109-131.

- 
- [45] **Desai JD, Desai AJ.** Production of biosurfactants. 1993, In: Kosaric, N (Ed.), *Biosurfactants: production, properties, application*. Marcel Dekker Inc., New York, 65-97, 1993.
- [46] **Jenkinson HF, Lamont RJ.** Streptococcal adhesion and colonization. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1997, 8, 2: 175-200.
- [47] **Poulsen K, Reinholdt J, Jespersgaard C, Boye K, Brown TA, Hauge M, Kilian M.** A comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infection and Immunity* 1998, 66, 1: 181-190.
- [48] **Park Y, Lamont RJ.** Contact-dependent protein secretion in *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 1998, 66, 10: 4777-4782.
- [49] **Mercer DK, Scott KP, Bruce-Johnson WA, Glover LA, Flint HJ.** Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65, 1: 6-10.
- [50] **Hudson MC, Curtiss R.** Regulation of expression of *Streptococcus mutans* genes important to virulence. *Infection and Immunity* 1990, 58, 2: 464-470.
- [51] **Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT, LeMoine JL.** Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res* 1997, 11, 1: 14-23.
- [52] **Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP.** Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology* 1996, 50, 727-751.
- [53] **Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP.** Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *The Journal of Clinical Investigation* 2003, 112, 11: 1626-1632.
- [54] **Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH.** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 1993, 260, 5111: 1127-1130.
- [55] **Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG.** A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 2002, 184, 10: 2699-2708.
- [56] **Dibdin GH.** Diffusion of sugars and carboxylic acids through human dental plaque in vitro. *Arch Oral Biol* 1981, 26, 515-523.
- [57] **McNee SG, Geddes DA, Weetman DA.** Diffusion of sugars and acids in human dental plaque in vitro. *Arch Oral Biol* 1982, 27, 975-979.
- [58] **McNee SG, Geddes DA, Weetman DA, Sweeney D, Beeley JA.** Effect of extracellular polysaccharides on diffusion of NaF and [14C]-sucrose in human dental plaque and in sediments of the bacterium *Streptococcus sanguis* 804 (NCTC 10904). *Archives of Oral Biology* 1982, 27, 11: 981-986.
- [59] **Dibdin GH, Shellis RP.** Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *Journal of Dental Research* 1988, 67, 6: 890-895.
- [60] **Ma Y, Lassiter MO, Banas JA, Galperin MY, Taylor KG, Doyle RJ.** Multiple glucan-binding proteins of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Bacteriology* 1996, 178, 6: 1572-1577.
- [61] **Hazlett KR, Mazurkiewicz JE, Banas JA.** Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the *gtfB* and *gtfC* genes. *Infection and Immunity* 1999, 67, 8: 3909-3914.
- [62] **Buddecke E.** Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1981.
- [63] **Main C, Geddes DA, McNee SG, Collins WJ, Smith DC, Weetman DA.** Instrumentation for measurement of dental plaque thickness in situ. *Journal of Biomedical Engineering* 1984, 6, 2: 151-154.
- [64] **Igarashi K, Lee IK, Schachtele CF.** Comparison of in vivo human dental plaque pH changes within artificial fissures and at interproximal sites. *Caries Research* 1989, 23, 6: 417-422.

- 
- [65] **Newman HN, Morgan WJ.** Topographical relationship between plaque and approximal caries. *Caries Research* 1980, 14, 6: 428-433.
- [66] **Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C.** Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Dental Research* 2000, 79, 1: 21-27.
- [67] **Wood SR, Kirkham J, Shore RC, Brookes SJ, Robinson C.** Changes in the structure and density of oral plaque biofilms with increasing plaque age. *FEMS Microbiology Ecology* 2002, 39, 3: 239-244.
- [68] **Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G.** Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 1994, 176, 8: 2137-2142.
- [69] **Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS.** Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology* 2003, 11, 2: 94-100.
- [70] **Tichy J, Novak J.** Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (*Streptococcus* sp.). *J Altern Complement Med* 1998, 4, 1: 39-45.
- [71] **Marsh PD.** Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *Journal of Dental Research* 1992, 71, 7: 1431-1438.
- [72] **Giertsen E, Scheie AA, Rolla G.** In vivo effects of zinc and chlorhexidine on dental plaque ureolysis and glycolysis. *Journal of Dental Research* 1989, 68, 6: 1132-1134.
- [73] **Giertsen E, Guggenheim B, Thurnheer T, Gmur R.** Microbiological aspects of an in situ model to study effects of antimicrobial agents on dental plaque ecology. *European Journal of Oral Sciences* 2000, 108, 5: 403-411.
- [74] **Banoczy J, Gombik A, Szoke J, Nasz I.** Effect of an antibacterial varnish and amine-fluoride/stannous fluoride (AmF/SnF<sub>2</sub>) toothpaste on *Streptococcus mutans* counts in saliva and dental plaque of children. *The Journal of Clinical Dentistry* 1995, 6, 2: 131-134.
- [75] **Seppa L, Forss H, Ogaard B.** The effect of fluoride application on fluoride release and the antibacterial action of glass ionomers. *Journal of Dental Research* 1993, 72, 9: 1310-1314.
- [76] **Wilson M, Harvey W.** Prevention of bacterial adhesion to denture acrylic. *Journal of Dentistry* 1989, 17, 4: 166-170.
- [77] **Dinis M, Tavares D, Fonseca AJ, Faria R, Ribeiro A, Silverio\_Cabrita AM, Ferreira P.** Therapeutic vaccine against *Streptococcus sobrinus*-induced caries. *Journal of Dental Research* 2004, 83, 4: 354-358.
- [78] **Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T, Ooshima T.** Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity* 1991, 59, 11: 4161-4167.
- [79] **Stashenko P, Peros WJ, Gibbons RJ, Dearborn SM.** Effect of monoclonal antibodies against lipoteichoic acid from the oral bacterium *Streptococcus mutans* on its adhesion and plaque-accumulation in vitro. *Archives of Oral Biology* 1986, 31, 7: 455-461.
- [80] **Hase JC, Attstrom R, Edwardsson S, Kelty E, Kisch J.** 6-month use of 0.2% delmopinol hydrochloride in comparison with 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo. (I). Effect on plaque formation and gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* 1998, 25, 9: 746-53.
- [81] **Rundegren J, Simonsson T, Petersson L, Hansson E.** Effect of delmopinol on the cohesion of glucan-containing plaque formed by *Streptococcus mutans* in a flow cell system. *Journal of Dental Research* 1992, 71, 11: 1792-1796.
- [82] **Maetani T, Miyoshi R, Nahara Y, Kawazoe Y, Hamada T.** Plaque accumulation on Teflon-coated metal. *J Prosthet Dent* 1984, 51, 3: 353-357.
- [83] **Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, Van Oss CJ, Neumann AW.** Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 1983, 46, 1: 90-97.
- [84] **Busscher HJ, Weerkamp AH, Van der Mei HC, Pelt AJW, de Jong HP, Arends J.** Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 1984, 48, 980-983.
- [85] **Van Oss CJ.** The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles - their determination and relative roles. *Biofouling* 1991, 4, 25-35.

- 
- [86] **Bhattacharjee S, Ko CH, Elimelech M.** DLVO - Interaction between rough surfaces. *Langmuir* 1998, 14, 3365-3375.
- [87] **Derjaguin BV, Landau LD.** Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physica Chimica USSR* 1941, 14, 633 ff.
- [88] **Ondracek G.** Mensch, Medizin und Material: Biowerkstoffe. *Keram. Zeitschrift* 1988, 40, 3: 169-176.
- [89] **Krawczynski J, Ondracek G.** Biomaterials - a research concept. 17, Bilateral Seminars of the International Bureau, Forschungszentrum Jülich (ISBN 3-89336-132-4): 8th SIMCER International Symposium on Ceramics, Rimini, 1992, 7-15.
- [90] **Fleer GJ, Scheutjens JM.** Modeling polymer adsorption, steric stabilization and flocculation. In: Dobias, B (ed.), Coagulation and flocculation. Marcel Dekker Inc., New York, 209-263, 1993.
- [91] **Uyen HM, Van der Mei HC, Weerkamp AH, Busscher HJ.** Comparison between the adhesion to solid substrata of *Streptococcus mitis* and that of polystyrene particles. *Applied and Environmental Microbiology* 1988, 54, 3: 837-838.
- [92] **Hamaker HC.** The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica* 1937, 4, 1058-1072.
- [93] **Rutter PR, Vincent B.** Physico-chemical interactions of the substratum, microorganisms and the fluid phase. In: Marshall, KC (ed.), Microbial adhesion and aggregation. Springer Verlag, Berlin, 1984, 21-38.
- [94] **Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJB.** Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial Ecology* 1989, 17, 1-15.
- [95] **Belle-Fontaine MN, Mozes N, Van der Mei HC, Sjollem J, Cerf O, Rouxhet PG, Busscher HJ.** A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics* 1990, 17, 93-106.
- [96] **Lie T.** Early dental plaque morphogenesis. A scanning electron microscope study using the hydroxyapatite splint model and a low-sucrose diet. *Journal of Periodontal Research* 1977, 12, 2: 73-89.
- [97] **Lie T.** Ultrastructural study of early dental plaque formation. *Journal of Periodontal Research* 1978, 13, 5: 391-409.
- [98] **Lie T.** Morphologic studies on dental plaque formation. *Acta Odontologica Scandinavica* 1979, 37, 2: 73-85.
- [99] **Nyvad B, Fejerskov O.** Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1987, 95, 4: 287-296.
- [100] **Newman HN.** Diet, attrition, plaque and dental disease. *British Dental Journal* 1974, 136, 12: 491-497.
- [101] **Brecx M, Theilade J, Attstrom R.** An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *Journal of Periodontal Research* 1983, 18, 2: 177-186.
- [102] **Barthlott W, Neinhuis C.** Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 1997, 202, 1-8.
- [103] **Sissons CH.** Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 1997, 11, 1: 110-126.
- [104] **Wimpenny JW.** The validity of models. *Advances in Dental Research* 1997, 11, 1: 150-159.
- [105] **Bowden GH, Li YH.** Nutritional influences on biofilm development. *Advances in Dental Research* 1997, 11, 1: 81-99.
- [106] **Listgarten MA.** The structure of dental plaque. *Periodontology* 2000 1994, 5, 52-65.
- [107] **Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M.** In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 1998, 84, 6: 1149-1155.
- [108] **Pigman W, Elliot HC, Laffre RO.** An artificial mouth for caries research. *J Dent Res* 1952, 31, 627-633.

- 
- [109] **Gilbert P.** The value of in-vitro models to the study of biofilms. In: Wimpenny J, Handley P, Gilbert P, Lappin-Scott H (eds.), *Life and Death of Biofilm*. BioLine, Cardiff, 1995, 13-16.
- [110] **Rose RK.** Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Archives of Oral Biology* 2000, 45, 7: 569-575.
- [111] **Rose RK, Turner SJ, Dibdin GH.** Effect of pH and calcium concentration on calcium diffusion in streptococcal model-plaque biofilms. *Archives of Oral Biology* 1997, 42, 12: 795-800.
- [112] **Zero DT, Scott-Anne K, Fu J.** Effect of plaque composition, plaque thickness and sucrose concentration on in situ demineralization (abstract). *J Dent Res* 1996, 75, 36.
- [113] **Schlegel HG.** Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1985.
- [114] **Burne RA, Chen YY, Penders JE.** Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms in vitro. *Adv Dent Res* 1997, 11, 1: 100-9.
- [115] **Pitten FA, Doering S, Kramer A, Rosin M.** In vitro assay for the screening of the plaque-reducing activity of antimicrobial agents. *Arzneimittel-Forschung* 2003, 53, 3: 182-187.
- [116] **Herles S, Olsen S, Afflitto J, Gaffar A.** Chemostat flow cell system: an in vitro model for the evaluation of antiplaque agents. *J Dent Res* 1994, 73, 11: 1748-55.
- [117] **Busscher HJ, Doornbusch GI, Van der Mei HC.** Adhesion of *Streptococcus mutans* to glass with and without a salivary coating as studied in a parallel-plate flow chamber. *J Dent Res* 1992, 71, 3: 491-500.
- [118] **Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ.** A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber. II: Analysis of the kinetics of co-adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 1995, 23, 2: 169-182.
- [119] **Singleton S, Treloar R, Warren P, Watson GK, Hodgson R, Allison C.** Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. *Adv Dent Res* 1997, 11, 1: 133-49.
- [120] **Bakke R, Trulear MG, Robinson JA, Characklis WG.** Activity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in steady state. *Biotechnology and Bioengineering* 1984, 26, 1418-1424.
- [121] **Gilbert P, Allison DG.** Laboratory methods for biofilm production. In: Denyer SP, Gorman SP, Sussman M (eds.), *Microbial biofilms: Formation and control*. Blackwell Scientific Publications, London, 1993, 29-49.
- [122] **Kharazmi A, Giwercman B, Hoiby N.** Robbins device in biofilm research. *Methods in Enzymology* 1999, 310, 207-15.
- [123] **Linton CJ, Sherriff A, Millar MR.** Use of a modified Robbins device to directly compare the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* RP62A to surfaces. *J Appl Microbiology* 1998, 86, 194-202.
- [124] **Millar MR, Linton CJ, Sherriff A.** Use of a continuous culture system linked to a modified Robbins device or flow cell to study attachment of bacteria to surfaces. *Methods in Enzymology* 2001, 337, 43-62.
- [125] **Fowler HW, McKay AJ.** The measurement of microbial adhesion. In: Berkeley RW, Lynch JM, Melling J, Rutter PR, Vincent B (eds.), *Microbial adhesion to surfaces*. Ellis Horwood, Chichester, 1980, 143-156.
- [126] **Sjollema J, Busscher HJ, Weerkamp AH.** Deposition of oral streptococci and polystyrene latices onto glass in a parallel plate flow cell. *Biofouling* 1988, 1, 101-112.
- [127] **Bradshaw DJ, Marsh PD, Schilling KM, Cummins D.** A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *J Appl Bacteriol* 1996, 80, 124-130.
- [128] **McKee AS, McDermid AS, Ellwood DC, Marsh PD.** The establishment of reproducible, complex communities of oral bacteria in the chemostat using defined inocula. *The Journal of Applied Bacteriology* 1985, 59, 3: 263-275.
- [129] **Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Beighton D.** Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiology* 1994, 140, 12: 3407-3412.
- [130] **Helmstetter CE, Cummings DJ.** An improved method for the selection of bacterial cells at division. *Biochimica et Biophysica Acta* 1963, 82, 608-610.
- [131] **Costerton JW.** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 1995, 15, 3: 137-140.
- [132] **Gilbert P, Allison DG, Evans DJ, Handley PS, Brown MR.** Growth rate control of adherent bacterial populations. *Appl Environ Microbiol* 1989, 55, 5: 1308-11.



- 
- [133] **Gilbert P, Das J, Foley I.** Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997, 11, 1: 160-7.
- [134] **Peters AC, Wimpenny JWT.** A constant depth laboratory film fermenter. *Biotechnology and Bioengineering* 1988, 32, 263-270.
- [135] **Wilson M.** Use of constant depth film fermentor in studies of biofilms of oral bacteria. *Methods Enzymol* 1999, 310, 264-79.
- [136] **Kinniment SL, Wimpenny JW.** Measurements of the distribution of adenylate concentrations and adenylate energy charge across *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 1992, 58, 5: 1629-1635.
- [137] **Kinniment SL, Wimpenny JWT, Adams D, Marsh PD.** Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiology* 1996, 142, 3: 631-638.
- [138] **Hope CK, Clements D, Wilson M.** Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 93, 3: 448-455.
- [139] **Kinniment SL, Wimpenny JWT, Adams D, Marsh PD.** The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system. *Journal of Applied Bacteriology* 1996, 81, 2: 120-125.
- [140] **Wilson M, Patel H, Noar JH.** Effect of chlorhexidine on multi-species biofilms. *Current Microbiology* 1998, 36, 1: 13-18.
- [141] **Wilson M, Patel H, Kpendema H, Noar JH, Hunt NP, Mordan NJ.** Corrosion of the intra-oral magnets by multi-species biofilms in the presence and absence of sucrose. *Biomaterials* 1997, 18, 1: 53-7.
- [142] **Russell C, Coulter WA.** Continuous monitoring of pH and Eh in bacterial plaque grown on a tooth in an artificial mouth. *Applied Microbiology* 1975, 29, 2: 141-144.
- [143] **Coulter WA, Russell C.** Effect of chlorhexidine on plaque development in an artificial mouth. *Microbios* 1976, 16, 63: 21-28.
- [144] **Coulter WA, Russell C.** pH and Eh in single and mixed culture bacterial plaque in an artificial mouth. *The Journal of Applied Bacteriology* 1976, 40, 1: 73-87.
- [145] **Russell C, Coulter WA.** Plaque formation by streptococci in an artificial mouth and factors influencing colonization. *The Journal of Applied Bacteriology* 1977, 42, 3: 337-344.
- [146] **Dibdin GH, Shellis RP, Wilson CM.** An apparatus for the continuous culture of micro-organisms on solid surfaces with special reference to dental plaque. *The Journal of Applied Bacteriology* 1976, 40, 3: 261-268.
- [147] **Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS.** A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res* 1991, 70, 11: 1409-16.
- [148] **Watson PS, Sissons CH, Devine DA, Shore RC, Kirkham J, Nattress BR, Marsh PD, Robinson C.** Minimizing prion risk without compromising the microbial composition of biofilms grown in vivo in a human plaque model. *Letters in Applied Microbiology* 2004, 38, 3: 211-216.
- [149] **Wong L, Sissons C, Sissions CH.** A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology* 2001, 46, 6: 477-486.
- [150] **Dolan MM, Murphy CV, Kavanagh BJ, Yankell SL.** Development of an in-vitro plaque model from human salivary sediment suspensions. *Arch Oral Biol* 1972, 17, 147-154.
- [151] **Bibby BG, Huang CT, Zero D, Mundorff SA, Little MF.** Protective effect of milk against in vitro caries. *Journal of Dental Research* 1980, 59, 10: 1565-1570.
- [152] **Noorda WD, Purdell-Lewis DJ, de Koning W, van Montfort AM, Weerkamp AH.** A new apparatus for continuous cultivation of bacterial plaque on solid surfaces and human dental enamel. *The Journal of Applied Bacteriology* 1985, 58, 6: 563-569.
- [153] **Noorda WD, Purdell-Lewis DJ, van Montfort AM, Weerkamp AH.** Monobacterial and mixed bacterial plaques of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in an artificial mouth: development, metabolism, and effect on human dental enamel. *Caries Research* 1988, 22, 6: 342-347.

- 
- [154] **Banas JA, Hazlett KR, Mazurkiewicz JE.** An in vitro model for studying the contributions of the *Streptococcus mutans* glucan-binding protein A to biofilm structure. *Methods in Enzymology* 2001, 337, 425-433.
- [155] **Donoghue HD, Dibdin GH, Shellis RP, Rapson G, Wilson CM.** Effect of nutrients upon *Streptococcus mutans* BHT and *Streptococcus mitior* LPA-1 growing in pure or mixed culture on human teeth in an artificial mouth. *The Journal of Applied Bacteriology* 1980, 49, 2: 295-304.
- [156] **Sissons CH, Wong L, Cutress TW.** Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. *Oral Microbiology and Immunology* 1995, 10, 3: 160-167.
- [157] **Owens DK, Wendt RC.** Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *J Appl Polymer Sci* 1969, 13, 1741-1747.
- [158] **Kaelble DH.** Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. *J Adhesion* 1970, 2, 66-81.
- [159] **Otto M.** Chemometrie. VCH, Weinheim, 1997.
- [160] **Kruskal WH.** A nonparametric test for the several sample problem. *Ann Math Stat* 1952, 23, 525-540.
- [161] **Busscher HJ, van P, de B, de J, Arends.** The effect of roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloid and Surfaces* 1984, 9, 319-331.
- [162] **Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J.** Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 2001, 22, 5: 481-487.
- [163] **Schmitt J, Flemming HC.** Die FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung von Biofilmen. *Werkstoffe und Korrosion* 1994, 45, 58-64.
- [164] **Flemming HC, Tamachkiarowa A, Klahre J, Schmitt J.** Monitoring of fouling and biofouling in technical systems. *Wat Sci Tech* 1998, 38, 8: 291-298.
- [165] **Borutta A.** Plaque - Ursache für Karies und marginalen Parodontitiden. *Oralprophylaxe* 1992, 14, 125-132.
- [166] **Krauß K.** Entwicklung und Einsatz einer DRIFTS-Meßzelle zur In-situ-Spektroskopie heterogen katalysierter Gasphasenoxidationen. Diss. Darmstadt, 2000.
- [167] **Deinzer R, Hilpert D, Bach K, Schawacht M, Herforth A.** Effects of academic stress on oral hygiene--a potential link between stress and plaque-associated disease? *Journal of Clinical Periodontology* 2001, 28, 5: 459-464.
- [168] **Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J.** Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 2002, 29, 5: 456-461.
- [169] **Ide K, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y.** The influence of albumin on corrosion resistance of titanium in fluoride solution. *Dental Materials Journal* 2003, 22, 3: 359-370.
- [170] **Canay S, Hersek N, Culha A, Bilgic S.** Evaluation of titanium in oral conditions and its electrochemical corrosion behaviour. *Journal of Oral Rehabilitation* 1998, 25, 10: 759-764.
- [171] **Mulligan AM, Wilson M, Knowles JC.** The effect of increasing copper content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. *Biomaterials* 2003, 24, 10: 1797-1807.
- [172] **Wirz J, Schmidli F, Petrini MG.** Metal intolerance. A frequent condition, but difficult to diagnose. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2003, 113, 3: 284-295.
- [173] **Scarano A, Piattelli M, Vrespa G, Caputi S, Piattelli A.** Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study. *The Journal of Oral Implantology* 2003, 29, 2: 80-85.
- [174] **Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Gobel UB.** Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clinical Oral Implants Research* 2001, 12, 6: 543-551.
- [175] **Badawi H, Evans RD, Wilson M, Ready D, Noar JH, Pratten J.** The effect of orthodontic bonding materials on dental plaque accumulation and composition in vitro. *Biomaterials* 2003, 24, 19: 3345-3350.
- [176] **Gaffar A, Afflitto J, Nabi N, Herles S, Kruger I, Olsen S.** Recent advances in plaque, gingivitis, tartar and caries prevention technology. *Int Dent J* 1994, 44, 1 Suppl 1: 63-70.

- 
- [177] **Gaffar A, Nabi N, Kashuba B, Williams M, Herles S, Olsen S, Afflitto J.** Antiplaque effects of dentifrices containing triclosan/copolymer/NaF system versus triclosan dentifrices without the copolymer. *American Journal of Dentistry* 1990, 3 Spec No, S7-S14.
- [178] **Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B.** An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Research* 2002, 36, 2: 93-100.
- [179] **Ullsfooss BN, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rolla G, Afseth J.** Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1994, 102, 2: 109-112.
- [180] **Tomita Y, Watanabe T, Takeuchi T, Nanbu A, Shinozaki N, Ikemi T, Fukushima K.** Effects of surfactants on glucosyltransferase production and in vitro sucrose-dependent colonization by *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology* 1998, 43, 9: 735-740.
- [181] **Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ.** Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity on the co-adhesion of oral microbial pairs. *Microbiology* 1996, 142 ( Part 9), 2355-2361.
- [182] **Rolla G.** Inhibition of adsorption-general considerations. In: Stiles HM, Loesche WJ, O'Brien TC (eds.), *Microbial aspects of dental caries*. IRL Press, Washington (DC), 1976, 309-324.
- [183] **Mandel ID.** The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *The Journal of the American Dental Association* 1989, 119, 2: 298-304.
- [184] **Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ.** Influence of temperature on the co-adhesion of oral microbial pairs in saliva. *European Journal of Oral Sciences* 1996, 104, 4 Part 1: 372-377.
- [185] **Busscher HJ, Quirynen M, Van der Mei HC.** Formation and prevention of dental plaque - a physico-chemical approach. In: Melo et al. (eds.), *Biofilms - Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, 327-354, 1992.
- [186] **Schakenraad JM, Busscher HJ, Wildevuur CR, Arends J.** Thermodynamic aspects of cell spreading on solid substrata. *Cell Biophysics* 1988, 13, 1: 75-91.
- [187] **Uyen M, Busscher HJ, Weerkamp AH.** Surface free energies of oral streptococci and their adhesion to solids. *FEMS Microbiol Letters* 1985, 30, 103-106.
- [188] **Wehle J.** Klinische Studie zur initialen In vivo-Plaqueeakkumulation auf verschiedenen Werkstoffen. Med. Diss. Göttingen 2004.
- [189] **Döring SJ.** Aufbau eines Prüfmodells zur in vitro-Testung der Anti-Plaques-Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen. Med. Diss. Greifswald 2002.
- [190] **Zaura-Arite E, Van Marle J, ten Cate JM.** Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *Journal of Dental Research* 2001, 80, 5: 1436-1440.
- [191] **Weerkamp AH, Quirynen M, Marechal M, Van der Mei HC, Van Steenberghe D, Busscher HJ.** The role of surface free energy in the early in vivo formation of dental plaque on human enamel and polymeric substrata. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1989, 2, 11-18.
- [192] **Van Dijk J, Herkstroeter F, Busscher HJ, Weerkamp A, Jansen H, Arends J.** Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs. *J Clinical Periodontology* 1987, 14, 5: 300-304.
- [193] **Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M.** In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989, 4, 4: 321-326.
- [194] **Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S.** Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *Journal of Dental Research* 2001, 80, 1: 363-370.
- [195] **Larsen T, Fiehn NE.** Development of a flow method for susceptibility testing of oral biofilms in vitro. *Apmis : Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica* 1995, 103, 5: 339-344.
- [196] **Allan I, Newman H, Wilson M.** Particulate Bioglass reduces the viability of bacterial biofilms formed on its surface in an in vitro model. *Clinical Oral Implants Research* 2002, 13, 1: 53-58.
- [197] **Kawai K, Urano M.** Adherence of plaque components to different restorative materials. *Operative Dentistry* 2001, 26, 4: 396-400.
- [198] **Butzki M.** In vitro-Plaqueeakkumulation auf verschiedenen dentalen Materialien. Med. Diss. Tübingen 1989.

- 
- [199] **Benderli Y, Ulukapi H, Balkanli O, Kulekci G.** In vitro plaque formation on some dental filling materials. *Journal of Oral Rehabilitation* 1997, 24, 1: 80-83.
- [200] **Dummer PM, Harrison KA.** In vitro plaque formation on commonly used dental materials. *Journal of Oral Rehabilitation* 1982, 9, 5: 413-417.
- [201] **Kouassi M, Michalesco P, Lacoste\_Armynot A, Boudeville P.** Antibacterial effect of a hydraulic calcium phosphate cement for dental applications. *Journal of Endodontics* 2003, 29, 2: 100-103.
- [202] **Noar JH, Evans RD, Wilson D, Costello J, Ioannou E, Ayeni A, Mordan NJ, Wilson M, Pratten J.** An in vitro study into the corrosion of intra-oral magnets in the presence of dental amalgam. *European Journal of Orthodontics* 2003, 25, 6: 615-619.
- [203] **Kawai K, Urano M, Ebisu S.** Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2000, 83, 6: 664-667.
- [204] **Hodgson RJ, Lynch RJM, Watson GK, Labarbe R, Treloar R, Allison C.** A continuous culture biofilm model of cariogenic responses. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 90, 440-448.
- [205] **Bowden GH.** Controlled environment model for accumulation of biofilms of oral bacteria. *Methods in Enzymology* 1999, 310, 216-224.
- [206] **Pratten J, Wilson M, Spratt DA.** Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbiology and Immunology* 2003, 18, 1: 45-49.
- [207] **De Jong MH, van der Hoeven JS, van OS JH, Olijve JH.** Growth of oral Streptococcus species and Actinomyces viscosus in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 1984, 47, 5: 901-904.
- [208] **Keevil CW, Hamilton IR.** Comparison of polyvinyl chloride membrane electrodes sensitive to alkylphosphonium ions for the determination of the electrical difference (delta psi) of Streptococcus mutans and Lactobacillus casei. *Analytical Biochemistry* 1984, 139, 1: 228-236.
- [209] **Keevil CW, Williamson MI, Marsh PD, Ellwood DC.** Evidence that glucose and sucrose uptake in oral streptococcal bacteria involves independent phosphotransferase and proton-motive force-mediated mechanisms. *Archives of Oral Biology* 1984, 29, 11: 871-878.
- [210] **Ökte E, Sultan N, Dogan B, Asikainen S.** Bacterial adhesion of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes to titanium implants: SEM evaluation. A preliminary report. *Journal of Periodontology* 1999, 70, 11: 1376-1382.
- [211] **Rupp F, Axmann D, Ziegler C, Geis-Gerstorfer J.** Adsorption/desorption phenomena on pure and Teflon AF-coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002, 62, 4: 567-578.
- [212] **Steinberg D, Klinger A, Kohavi D, Sela MN.** Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials* 1995, 16, 17: 1339-1343.
- [213] **Cutress TW, Sissons CH, Pearce EI, Wong L, Anderssen K, Angmar-Mansson B.** Effects of fluoride-supplemented sucrose on experimental dental caries and dental plaque pH. *Adv Dent Res* 1995, 9, 1: 14-20.
- [214] **Bloomquist CG, Reilly BE, Liljemark WF.** Adherence, accumulation, and cell division of a natural adherent bacterial population. *Journal of Bacteriology* 1996, 178, 4: 1172-1177.
- [215] **van Houte J.** Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research* 1994, 73, 3: 672-681.
- [216] **Hahn R, Netuschil L, Löst C.** Initiale Plaquebesiedlung keramischer Restaurationsmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 1992, 47, 330-334.
- [217] **Walberg M, Gaustad P, Steen HB.** Uptake kinetics of nucleic acid targeting dyes in S. aureus, E. faecalis and B. cereus: a flow cytometric study. *Journal of Microbiological Methods* 1999, 35, 2: 167-176.
- [218] **Rutter PR, Vincent B.** Attachment mechanisms in the surface growth of organisms. In: Bazin MJ, Prosser JI, (eds.), CRC series in mathematical models in microbiology, physiological models in microbiology. Vol. II, CRC Press, Boca Raton, 1988, 87-107.

- 
- [219] **McLean RJ, Whiteley M, Hoskins BC, Majors PD, Sharma MM.** Laboratory techniques for studying biofilm growth, physiology and gene expression in flowing systems and porous media. *Methods in Enzymology* 1999, 310, 248-264.
- [220] **Costerton JW.** Cleaning techniques for medical devices: biofilms. *Biomed Instrum Technol* 1997, 31, 3: 222-6, 247.
- [221] **Qian Z, Sagers RD, Pitt WG.** The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms. *Annals of Biomedical Engineering* 1997, 25, 1: 69-76.
- [222] **Johnson LL, Peterson RV, Pitt WG.** Treatment of bacterial biofilms on polymeric biomaterials using antibiotics and ultrasound. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998, 9, 11: 1177-1185.
- [223] **Skopek RJ, Liljemark WF, Bloomquist CG, Rudney JD.** Dental plaque development on defined streptococcal surfaces. *Oral Microbiology and Immunology* 1993, 8, 1: 16-23.
- [224] **Nyvad B, Kilian M.** Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987, 95, 5: 369-380.
- [225] **Goodson JM, Shoher I, Imber S, Som S, Nathanson D.** Reduced dental plaque accumulation on composite gold alloy margins. *Journal of Periodontal Research* 2001, 36, 4: 252-259.
- [226] **Nyvad B, Fejerskov O.** Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res* 1989, 23, 3: 151-158.
- [227] **Gilbert P, Evans DJ, Brown MR.** Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. *J Appl Bacteriol* 1993, 74 Suppl, 67S-78S.
- [228] **Tullberg A.** An experimental study of the adhesion of bacterial layers to some restorative dental materials. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1986, 94, 2: 164-173.
- [229] **Rosochacki SJ, Matejczyk M.** Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology. *Acta Microbiol Pol* 2002, 51, 3: 205-216.
- [230] **Aspiras MB, Kazmerzak KM, Kolenbrander PE, McNab R, Hardegen N, Jenkinson HF.** Expression of green fluorescent protein in *Streptococcus gordonii* DL1 and its use as a species-specific marker in coadhesion with *Streptococcus oralis* 34 in saliva-conditioned biofilms in vitro. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66, 9: 4074-4083.
- [231] **Wang S, Hazelrigg T.** Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 1994, 369, 6479: 400-403.
- [232] **Yoshida A, Kuramitsu HK.** *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a *gtfB* promoter-green fluorescent protein (*PgtfB::gfp*) construct to monitor development. *Microbiology* 2002, 148, Pt 11: 3385-3394.
- [233] **Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A, Artweiler NB.** Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Archives of Oral Biology* 2001, 46, 5: 471-476.
- [234] **Gmür R, Guggenheim B, Giertsen E, Thurnheer T.** Automated immunofluorescence for enumeration of selected taxa in supragingival dental plaque. *European Journal of Oral Sciences* 2000, 108, 5: 393-402.
- [235] **Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Gobel UB, Friedmann A, Bernimoulin J.** A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *Fems Microbiology Letters* 2000, 191, 1: 95-101.
- [236] **Appelbaum B, Golub E, Holt SC, Rosan B.** In vitro studies of dental plaque formation: adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect Immun* 1979, 25, 2: 717-728.
- [237] **Olsson J, Carlen A, Holmberg K.** Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence by means of surface hydrophilization. *Journal of Dental Research* 1990, 69, 9: 1586-1591.
- [238] **Baier RE, Glantz PO.** Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces. *Acta Odontologica Scandinavica* 1978, 36, 5: 289-301.
- [239] **Carter K, Landini G, Walmsley AD.** Plaque removal characteristics of electric toothbrushes using an in vitro plaque model. *J Clin Periodontol* 2001, 28, 1045-1049.
- [240] **Adamczyk E, Spiechowicz E.** Plaque accumulation on crowns made of various materials. *The International Journal of Prosthodontics* 1990, 3, 3: 285-291.

- 
- [241] **Rasperini G, Maglione M, Cocconcetti P, Simion M.** In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clinical Oral Implants Research* 1998, 9, 6: 357-364.
- [242] **Rimondini L, Fare S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, Carrassi A.** The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *Journal of Periodontology* 1997, 68, 6: 556-562.
- [243] **Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A.** Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *Journal of Periodontology* 2004, 75, 2: 292-296.
- [244] **Siegrist BE, Brex MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP.** In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clin Oral Implants Res* 1991, 2, 1: 38-46.
- [245] **Takeuchi H, Yamamoto K.** Ultrastructural analysis of structural framework in dental plaque developing on synthetic carbonate apatite applied to human tooth surfaces. *European Journal of Oral Sciences* 2001, 109, 4: 249-259.
- [246] **Zee KY, Samaranayake LP, Attstrom R.** Scanning electron microscopy of microbial colonization of 'rapid' and 'slow' dental-plaque formers in vivo. *Archives of Oral Biology* 1997, 42, 10/11: 735-742.
- [247] **Zurcchelli G, Cesari C, Clauser C, Desantis M.** Early bacterial accumulation on guided tissue regeneration membrane materials. An in vivo study. *Journal of Periodontology* 1998, 69, 11: 1193-1202.
- [248] **Hannig M.** Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *European Journal of Oral Sciences* 1999, 107, 1: 55-64.
- [249] **Cowan AJ, Wilson NH, Wilson MA, Watts DC.** The application of ESEM in dental materials research. *J Dent Res* 1996, 75, 5: 375-377.
- [250] **Shehada RE, Marmarelis VZ, Mansour HN, Grundfest WS.** Laser induced fluorescence attenuation spectroscopy: detection of hypoxia. *IEEE Trans Biomed Eng* 2000, 47, 3: 301-312.
- [251] **Heyerdahl H, Wang I, Liu DL, Berg R, Andersson-Engels S, Peng Q, Moan J, Svanberg S, Svanberg K.** Pharmacokinetic studies on 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tumours and normal tissues. *Cancer Letters* 1997, 112, 2: 225-31.
- [252] **Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D.** The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1996, 11, 2: 169-178.
- [253] **Von Mierau HD, Wuestefeld L, Holler-Huebsch M, Spindler T, Hering B.** Rauigkeitsuntersuchungen an vestibulären und lingualen Zahnoberflächen. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 1982, 37, 176-180.
- [254] **Yamauchi M, Yamamoto K, Wakabayashi M, Kawano J.** In vitro adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture. *Dental Materials Journal* 1990, 9, 1: 19-24.
- [255] **Bellanda M, Cassinelli C, Morra M.** Reduced plaque accumulation on hydrocarbon thin film deposited on restorative acrylic polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997, 36, 2: 216-222.
- [256] **Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M.** Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials* 1997, 13, 4: 258-269.
- [257] **Absolom DR.** The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Canadian Journal of Microbiology* 1988, 34, 3: 287-298.
- [258] **Van Pelt AWJ, Van der Mei HC, Busscher HJ, Arends J, Weerkamp AH.** Surface free energy of oral streptococci. *FEMS Microbiol Letters* 1984, 25, 279-282.
- [259] **Glantz PO.** The surface tension of saliva. *Odontologisk Revy* 1970, 21, 2: 119-127.
- [260] **Sonju T, Rolla G.** Pellicle formation on mylar strips and other artificial surfaces. *Journal of Periodontal Research* 1972, 10, 20-21.

- 
- [261] **Ilie N, Kunzelmann KH, Felten K, Hickel R.** Oberflächeneigenschaften von Dentalrestaurationsmaterialien in Abhängigkeit von der Pellikelbildung. *Dtsch Zahnärztl Z* 2003, 58, 38-41.
- [262] **Arnold WH, Gaengler P, Sabov K, Schmitz I, Gedalia I, Steinberg D.** Induction and 3D reconstruction of caries-like lesions in an experimental dental plaque biofilm model. *Journal of Oral Rehabilitation* 2001, 28, 8: 748-754.
- [263] **Olsson J, Van der Heijde Y, Holmberg K.** Plaque formation in vivo and bacterial attachment in vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Caries Research* 1992, 26, 6: 428-433.
- [264] **Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Geckeler KE.** Dental implant materials: Surface modification and interface phenomena. *Adv Mater* 1996, 8, 3: 254-257.
- [265] **Kraemer A, Weber H, Geis-Gerstorfer J.** Plaqueansammlung an Implantat- und prothetischen Werkstoffen - eine klinische Studie. *Z Zahnärztl Implantol* 1989, V, 283-286.
- [266] **Krekeler G, Pelz K, Rediker A.** Die Plaqueanhaftung an verschiedenen Implantatwerkstoffen. *Z Zahnärztl Implantol* 1990, V, 191-194.
- [267] **Joshi RI, Eley A.** The in-vitro effect of a titanium implant on oral microflora: comparison with other metallic compounds. *J Med Microbiol* 1988, 27, 2: 105-107.
- [268] **Nesbitt WE, Doyle RJ, Taylor KG.** Hydrophobic interactions and the adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Infect Immun* 1982, 38, 2: 637-644.
- [269] **Boulange-Petermann L, Baroux K, Bellon-Fontaine J.** The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. In: Mittal, KL (ed.), Contact angle, wettability and adhesion. 1993, 839-848.
- [270] **Kitano T, Yutani Y, Shimazu A, Yano I, Ohashi H, Yamano Y.** The role of physicochemical properties of biomaterials and bacterial cell adhesion in vitro. *Int J Artif Organs* 1996, 19, 6: 353-358.
- [271] **Van der Valk P, Van Pelt AWJ, Busscher HJ, de Jong HP, Wildevuur CRH, Arends J.** Interactions of fibroblasts and polymer surfaces: Relationship between surface free energy and fibroblast spreading. *J Biomed Mat Res* 1988, 17, 807-817.
- [272] **Bacakova L, Svorcik V, Rybka V, Micek I, Hnatowicz V, Lisa V, Kocourek F.** Adhesion and proliferation of cultured human aortic smooth muscle cells on polystyrene implanted with N<sup>+</sup>, F<sup>+</sup> and Ar<sup>+</sup> ions: correlation with polymer surface polarity and carbonization. *Biomaterials* 1996, 17, 11: 1121-1126.
- [273] **Glantz PO.** Adhesiveness on teeth. *J Coll Int Sci* 1971, 37, 281-290.
- [274] **Rijnaarts H.** Interactions between bacteria and solid surfaces in relation to bacterial transport in porous media. Diss. Wageningen 1994.
- [275] **Afseth J, Oppermann RV, Rolla G.** Accumulation of Cu and Zn in human dental plaque in vivo. *Caries Res* 1983, 17, 310-314.
- [276] **Arweiler NB, Auschill TM, Donos N, Sculean A.** Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. *Clin Oral Investig* 2002, 6, 4: 205-209.
- [277] **Castellani D, Bechelli C, Tiscione E, Lo Nostro A, Pierleoni PP.** In vivo plaque formation on cast ceramic (Dicor) and conventional ceramic. *The International Journal of Prosthodontics* 1996, 9, 5: 459-465.
- [278] **Connor JN, Schoenfeld CM, Taylor RL.** Study of in vivo plaque formation. *Journal of Dental Research* 1976, 55, 3: 481-488.
- [279] **Ellingsen JE, Svatun B, Rolla G.** The effects of stannous and stannic ions on the formation and acidogenicity of dental plaque in vivo. *Acta Odontol Scand* 1980, 38, 219-222.
- [280] **Igarashi K, Kamiyama K, Yamada T.** Measurement of pH in human dental plaque in vivo with an ion-sensitive transistor electrode. *Arch Oral Biol* 1981, 26, 3: 203-207.
- [281] **Lingstrom P, Van Ruyven FOJ, Van Houte J, Kent R.** The pH of dental plaque in its relation to early enamel caries and dental plaque flora in humans. *Journal of Dental Research* 2000, 79, 2: 770-777.
- [282] **Nakazato G.** Studies on plaque formed on implants. *The Journal of Gifu Dental Society* 1990, 17, 1: 131-151.

- 
- [283] **Okita N, Orstavik D, Orstavik J, Ostby K.** In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. *Dent Mater* 1991, 7, 3: 155-160.
- [284] **Orstavik D, Ruangsri P.** Effects of bactericidal treatments on bacterial adherence and dental plaque formation. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1979, 87, 4: 296-301.
- [285] **Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, Kusa L, Nakagaki H, Kato K, Nattress B.** A method for the quantitative site-specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed in vivo. *Caries Research* 1997, 31, 3: 194-200.
- [286] **Roos EH, Donly KJ.** In vivo dental plaque pH variation with regular and diet soft drinks. *Pediatr Dent* 2002, 24, 350-353.
- [287] **Rykke M, Ellingsen JE, Sonju T.** Chemical analysis and scanning electron microscopy of acquired pellicle formed in vivo on stannous fluoride treated enamel. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1991, 99, 3: 205-211.
- [288] **Slack GL, Bowden GH.** Preliminary studies of experimental dental plaque in vivo. *Advances in Fluorine Research and Dental Caries Prevention* 1965, 21, 193-215.
- [289] **Svanberg M, Mjor IA, Orstavik D.** Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *Journal of Dental Research* 1990, 69, 3: 861-864.
- [290] **Tanaka M, Margolis HC.** Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Archives of Oral Biology* 1999, 44, 3: 253-258.
- [291] **Trapp LD, Noble WH, Navarro R, Green E.** Objective quantification method for measuring in vivo accumulated dental plaque. *Journal of Dental Research* 1975, 54, 1: 164-167.
- [292] **Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M.** An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses in vivo. *Archives of Oral Biology* 1998, 43, 7: 559-565.
- [293] **White DJ, Cox ER, Liang N, Macksood D, Bacca L.** A new plaque glycolysis and regrowth method (PGRM) for the in vivo determination of antimicrobial dentifrice/rinse efficacy towards the inhibition of plaque growth and metabolism: Method development, validation and initial activity screens. *Journal of Clinical Dentistry* 1995, 6, SPEC. ISSUE: 59-70.
- [294] **Yeung AL, Lo EC, Chow TW, Clark RK.** Oral health status of patients 5-6 years after placement of cobalt-chromium removable partial dentures. *Journal of Oral Rehabilitation* 2000, 27, 3: 183-189.
- [295] **Zee KY, Samaranayake LP, Attstrom R.** An in vivo replica study of microbial colonization in "rapid" and "slow" dental plaque formers. *Apmis* 2000, 108, 2: 113-121.
- [296] **Zerres GM.** Plaqueakkumulation auf verschiedenen Implantatoberflächenbeschichtungen in vivo. Med. Diss Tübingen 2002.
- [297] **Savitt ED, Malament KA, Socransky SS, Melcer AJ, Backman KJ.** Effects on colonization of oral microbiota by a cast glass-ceramic restoration. *J Periodontics Restorative Dent* 1987, 7, 2: 22-35.
- [298] **Olsson J.** Studies on initial streptococcal adherence. Thesis, Göteborg, 1978.
- [299] **Navarro-Villoslada F, Orellana G, Moreno-Bondi MC, Vick T, Driver M, Hildebrand G, Liefelth K.** Fiberoptic luminescent sensors with composite oxygen-sensitive layers and anti-biofouling coatings. *Analytical Chemistry* 2001, 73, 21: 5150-5156.
- [300] **Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C.** An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 1999, 50, 1: 1-7.



## A Anhang

### Publikationen

#### Mit Bezug zum Thema der Dissertation

##### Veröffentlichungen

**Schade R, Liefeith K.** In-vitro Biokompatibilitätsprüfung auf der Basis von Bioreaktoren. *Biotec* 1998; 4: 36-39.

**Schade R, Liefeith K.** Fließkammersysteme zur Biofilmanalyse. *Biotec* 1999; 3: 26-30.

**Schade R, Liefeith K.** Development of a bioreactor based test system to investigate plaque induced material degradation. In: Stallforth H, Revell P. Materials for Medical Engineering - EUROMAT 99, Vol. 2. Wiley-VCH, 1999, 243-249.

**Schade R, Hildebrand G, Frant M, Liefeith K.** Bioreactor based test system for in vitro plaque testing on dental materials. (in Vorbereitung)

**Schade R, Wehle J, Hüls A, Liefeith K.** In vivo validation of a bioreactor-based plaque testing system. (in Vorbereitung)

##### Vorträge

**Schade R:** Simulation mikrobiologischer Plaqueschichten auf dentalen Materialien. 2. Thüringer Biomaterialkolloquium, Erfurt, 15.01.99.

**Schade R, Liefeith K.** Dental plaque formation depending on material surface parameters—in vitro investigations. 18<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Stuttgart, 02.10.2003.

**Schade R, Liefeith K.** An In Vitro Testing System Based on Bioreactor Technology for the Analysis of Biofilm Formation on Dental Materials. First European Conference on: Biofilm Prevention of Microbial Adhesion, Osnabrück, 02.04.2004.

##### Poster

**Schade R, Liefeith K.** Biokompatibilitätsprüfung von Implantatlegierungen unter dem Einfluß von Proteinen im Laborbioreaktor. 15. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Münster, 1997.

**Schade R, Liefeith K.** In -vitro-Bestimmung der Biokompatibilität von Biomaterialien auf der Basis von Bioreaktoren im on-line-Verfahren. Achema, Frankfurt, 1997.

**Liefeith K, Schade R, Frant M.** Flow chamber system for Investigation of the Interface Situation between Biomaterial/Biosystem. Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V., Jena, 1998.

**Liefeith K, Schade R, Hildebrand G, Frant M.** Biotechnological tools for investigations of biofilms. Innovationskongreß Chemie und Biotechnologie, Jena, 2001.

**Liefeith K, Schade R, Hildebrand G, Frant M.** Neue Systeme für die Prüfung zahnärztlicher Werkstoffe. Innovationskongreß Chemie und Biotechnologie, Jena, 2001.

**Liefeith K, Frant M, Hildebrand G, Schade R.** New biomimetic antifouling coatings for biotechnology and medicine. BIOTECHNICA, Hannover, 2001.

### **Mit Bezug zu weiteren Forschungsthemen**

#### **Veröffentlichungen**

**Sauerstein J, Schade R, Emde J, Reuter G.** Nachweis einer Fructokinase und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Basic Microbiol* 1991; 31, 1: 75-79.

**Schade R, Hartleb M, Liefeith K.** Comparative studies on the proliferation of fibroblasts on metallic biomaterials. *Internal Medicine* 1997; 5, 3: 163-168.

**Gastrock G, Lemke K, Schade R, Hildebrand G, Metze J.** Hydrodynamic Influence on Sampling Systems in Bioreactors. *Chem Eng Technol* 2001; 24, 4: 351-354.

**Liefeith K, Hildebrand G, Schade R, Szmukler-Moncler S, Perrin D, Glien W, Rahm J.** Electrochemical deposited CaP coatings on TPS-substrates. *European Cells and Materials* 2001; 1, 2: 60 ff.

**Hildebrand G, Liefeith K, Schade R, Szmukler-Moncler S, Perrin D, Glien W, Rahm J.** Bioaktive, schnell resorbierbare CaP-Schichten auf porösen Reintitanschichten (PROTHEBONE®) mit verbesserter Osteointegration. *BIOMaterialien* 2001; 2, 2/3: 103 ff.

**Liefeith K, Hildebrand G, Schade R, Perrin D, Szmukler-Moncler S, Rahm J, Glien A.** A degradable ceramic coating for deposition of load bearing implants. *BIOMaterialien* 2003; 4, 2: 125 ff.

#### **Vorträge**

**Schade R, Hartleb M, Liefeith K.** Vergleichende Untersuchungen zur Proliferation von Weichgewebszellen auf metallischen Biowerkstoffen. X. Colloquium on Biomaterials; Aachen, 13.02.1997.

**Schade R, Liefeith K.** A new concept for electrochemical and biological reference testing of metallic biomaterials. 2<sup>nd</sup> Interdisciplinary Essen-Symposium of the Working Group on „Biomaterials and Tissue Compatibility“, Essen, 07.10.1999.

---

**Poster**

**Schade R, Hartleb M, Liefeith K.** In-vitro Zytotoxizitätsprüfung von metallischen Biowerkstoffen mit Zellen des Weichgewebes. 8. Heiligenstädter Kolloquium, Heiligenstadt, 1996.

**Kunze S, Schade R, Hildebrand G, Liefeith K, Metze J.** Use of AFM and SEM to study blood cell adhesion on different sensor materials. Conference of Advanced Science, Augustusburg, 1999.

**Hildebrand G, Liefeith K, Schade R, Szmukler-Moncler S, Perrin D, Glien W, Rahm J.** Prothebone-A fully resorbable CaP coating on macrostructured metallic implants. 17<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Barcelona, 2002.

**Frant M, Schade R, Scholze M, Liefeith K, Hausner M.** Biofilmgestützte Abwasseraufbereitung im Rahmen eines Multibarrierkonzeptes. 11. Heiligenstädter Kolloquium, Heiligenstadt, 2002.

**Frant M, Schade R, Liefeith K.** Silk Proteins–Biomedical Applications. 3<sup>rd</sup> International Technology Transfer Days Biomaterial, Erfurt, 2002.

**Liefeith K, Hildebrand G, Schade R, Perrin D, Szmukler-Moncler S, Rahm J, Glien W.** A degradable ceramic coating for deposition of load bearing implants Symposium. Interface Biology of Implants, Rostock, 2003.

**Schade R, Hildebrand G, Liefeith K.** Online investigations on the oxygen consumption of biomaterial affected cell culture. 18<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Stuttgart, 2003.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Ronald Schade  
Geburtstag/-ort: 12. Dezember 1964, Hildburghausen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

### Schulbildung

1971 – 1973 Polytechnische Oberschule Hildburghausen  
1973 - 1979 Polytechnische Oberschule Leinefelde  
1979 – 1983 Erweiterte Oberschule Leinefelde (Abitur)  
  
1983 – 1985 Tätigkeit in der Baumwollspinnerei Leinefelde  
1985 – 1986 Grundwehrdienst

### Studium

1986 - 1991 Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Abschluß: Diplom (Thema: Alginatbildung durch *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: Chemische Charakterisierung des Alginats sowie Untersuchungen zur Bildungskinetik und Biosynthese)  
  
1991 - 1993 Forschungsstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Fachrichtung: Mikrobiologie (Untersuchungen zur Physiologie und Biosynthese der Alginatbildung durch *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)

### Beruflicher Werdegang

1993 - 1994 Wiss. Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie (Lehrstuhl Technische Mikrobiologie) der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
  
1994 - 2004 Wiss. Mitarbeiter am Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba) Heilbad Heiligenstadt  
Arbeitsbereiche: Zellbiologie, Zytotoxizitätstestung von Biomaterialien  
Biofilmuntersuchungen  
Entwicklung biotechnologischer Prüfverfahren  
Tissue Engineering

## Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Stephan Diekmann, dem Doktorvater dieser Arbeit, der sich freundlicherweise bereit gefunden hat, das Thema eines externen, aber trotzdem noch sehr mit Jena verbundenen Doktoranden zu betreuen. Durch seine Unterstützung, aufmunternden Worte und Geduld wurde der Grundstein für diese Arbeit gelegt,

Herrn Dr.-Ing. Klaus Liefeth, der mir als Materialwissenschaftler und Fachbereichsleiter durch viele anregende Diskussionen die Faszination eines fachübergreifenden Arbeitsgebietes nahe gebracht hat und durch sein Engagement wesentlich zur materiellen und methodischen Absicherung der Arbeiten beitrug,

Herrn Jens Wehle für die Präparation der Praxismaterialien und die nette Zusammenarbeit während der Planung und Durchführung der validierenden in vivo-Studie, von deren Ergebnissen auch diese Arbeit profitiert,

meinen netten Kollegen

Marion Frant, die als stets ansprechbare Mitarbeiterin die Oberflächenenergie fest im Griff hatte und so manchen wertvollen Hinweis für die Interpretation der Daten gab,

Gerhard Hildebrand für die unermüdliche Arbeit am Rasterelektronenmikroskop,

Sebastian Kaufhold für die statistische Analyse,

Jürgen Rost für die FEM-Modellierung des Kanals der Fliesskammern und für die Hilfe bei der theoretischen Einarbeitung in Probleme der Strömungslehre,

Annerose Lindenbauer, Sandra Gries und Hubert Weber als gute Seelen des mikrobiologischen Labors,

der Degussa-Hüls AG/DeguDent GmbH sowie C.Hafner GmbH + Co. und Wieland Dental-Technik GmbH & Co. KG für die Bereitstellung von Proben und die großzügige finanzielle Förderung der Arbeiten

und vor allem meiner Familie, die dafür gesorgt hat, dass die vielen großen und kleinen Dinge des Alltags weitestgehend unsichtbar blieben.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Alle benutzten Hilfsmittel und Quellen wurden in der Arbeit angegeben.

Ich versichere, dass ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe noch Dritte von mir unmittelbare oder mittelbare geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder eine gleiche Arbeit noch in wesentlichen Teilen ähnliche Arbeit oder Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Die Personen, die mich methodisch bzw. inhaltlich bei der Auswertung der Ergebnisse unterstützt haben, sind in der Danksagung genannt.

Heilbad Heiligenstadt, 24.08.2004

(Ronald Schade)